

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

UNIDAD DE POSTGRADO

**Caracterización molecular de genotipos de
Enterocytozoon bienersi y ensamblajes de Giardia
duodenalis aislados de heces de crías de alpaca (Vicugna
pacos)**

TESIS

Para para optar el Grado Académico de Magíster en Salud Animal

AUTOR

Luis Antonio Gómez Puerta

Lima – Perú

2013

Esta tesis me da la oportunidad de agradecer a todas aquellas personas e instituciones que han hecho posible que este estudio haya sido llevado a término.

En primer lugar, quiero agradecer al Departamento de Epidemiología y Economía Veterinaria de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. En este sentido, quiero manifestar mis más sinceros agradecimientos a mis mentores al Dr. Armando González y a la Dra. Teresa López, por haberme aceptado como investigador en su grupo de trabajo y haberme apoyado en todo momento.

Durante las estancias en la División de Enfermedades Parasitarias del Centro de Control de Enfermedades de los Estados Unidos (CDC), agradezco a todos aquellos que han mostrado interés en este trabajo y facilitado la resolución del mismo. En este sentido no puedo olvidar a los doctores Lihua Xiao y al doctor Vitaliano Cama por hacer posible la realización de las técnicas moleculares usadas y por el interés demostrado.

A todas las empresas alpaqueras de Cuzco y Puno, las cuales permitieron el uso de sus animales para la realización del estudio.

A los compañeros de trabajo Dr. Cesar Gavidia, Giovanna Cribillero, Ana Vargas, Gianfranco Arroyo, Juan Calcina, Juan Olazabal, Gianina Espinoza, Judith Lozano y Elton Sánchez, por todo el apoyo, los momentos compartidos y por la ayuda prestada.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO.....	ii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	vii
LISTA DE APENDICE.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	3
1. <i>Enterocytozoon bienewisi</i>	3
1.1. Introducción.....	3
1.2. Biología.....	4
1.2.1. Estatus taxonómico y filogenia.....	4
1.2.2. Morfología.....	6
1.2.3. Genotipos.....	7
1.2.4. Ciclo de Vida.....	8
1.2.5. Invasión celular.....	9
1.3. Epidemiología.....	12
1.3.1. Prevalencia y distribución geográfica.....	14
1.3.2. Fuentes de infección y modo de transmisión.....	15
1.3.2.1. Humanos (Transmisión vertical y Horizontal).....	15
1.3.2.2. Animales (Potencial zoonótico).....	16
1.3.2.3. Agua (Transmisión por agua).....	17
1.3.2.4. Alimento (Transmisión por alimento).....	17
1.3.2.5. Artrópodos (Transmisión por vectores).....	18
1.4. Lesiones.....	18
1.5. Diagnóstico.....	19
1.6. Inmunología.....	20
1.6.1. Respuesta inmune mediada por células.....	20
1.6.2. Respuesta inmune humoral.....	21
1.7. Tratamiento.....	22

2. <i>Giardia duodenalis</i>	23
2.1. Introducción.....	23
2.2. Taxonomía.....	24
2.2.1. Especies de <i>Giardia</i>	25
2.2.2. Genotipos (ensamblajes) de <i>Giardia duodenalis</i>	28
2.3. Epidemiología molecular.....	31
2.4. Ciclos de transmisión.....	32
2.4.1. Humanos.....	32
2.4.2. Ganado.....	33
2.4.3. Perros y gatos.....	35
2.4.4. Animales silvestres.....	35
2.4.5. Zoonosis y transmisión por agua.....	36
2.5. Patogénesis y signos clínicos.....	41
2.6. Diagnóstico.....	43
2.6.1. Examen microscópico.....	43
2.6.2. Detección de antígeno.....	44
2.6.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR).....	45
2.7. Tratamiento y control.....	46
2.7.1. Tratamiento quimioterapéutico.....	46
2.7.1.1. Benzimidazoles.....	46
2.7.1.2. Paromomicina.....	47
2.7.2. Enfoques alternativos.....	48
2.7.2.1. Vacunación.....	48
2.8. Control.....	50
2.8.1. Medidas de soporte al tratamiento.....	50
2.8.2. Medidas para prevenir la infección.....	51
III. MATERIALES Y METODOS.....	52
1. Materiales.....	52
1.1. Diseño de estudio.....	52
1.2. Lugar de estudio.....	52
1.3. Número de muestras.....	53
2. Métodos.....	53
2.1. Colecta y conservación de las muestras.....	53

2.2. Técnicas moleculares.....	53
2.3. Extracción de ADN usando la técnica FastDNA® SPIN Kit (For Soil).....	54
2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Nested-PCR) para la detección de <i>E. bieneusi</i>	54
2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Nested-PCR) para la detección de <i>G. duodenalis</i>	56
2.6. Secuenciación de ADN de los productos amplificados.....	58
2.6.1. Limpieza del producto de PCR	58
2.6.2. Reacción del ciclo-secuenciación.....	59
2.6.3. Purificación.....	60
2.6.4. Pasos previos al funcionamiento en el secuenciador.....	61
2.7. Análisis de secuencias.....	61
2.8. Análisis estadístico.....	62
IV. RESULTADOS.....	63
V. DISCUSIÓN.....	72
VI. CONCLUSIONES.....	78
VII. LITERATURA CITADA.....	79
VIII. APENDICE.....	105

RESUMEN

Enterocytozoon bienersi y *Giardia duodenalis* son considerados como los parásitos intestinales más comunes de seres humanos, animales domésticos, silvestres y en cautiverio. Estos patógenos son responsables de causar diarrea en individuos inmunocomprometidos e inmunocompetentes. El presente estudio tuvo por objetivo identificar los genotipos de *E. bienersi* y *G. duodenalis* en muestras de heces de crías de alpaca. Las muestras de heces usadas en el estudio correspondieron a 126 crías de alpaca de 1 a 30 días de edad, de tres regiones geográficas en los andes del Perú (Huancavelica, Cuzco y Puno). Para el diagnóstico se amplificó mediante PCR anidado la región espaciador transcrito interno (ITS) del gen ARNr de *E. bienersi*, así como el locus trifosfato isomerasa (TPI) de *G. duodenalis*. Todas las muestras positivas (*E. bienersi* = 65; *G. duodenalis* = 42) fueron secuenciadas. Sesenta y cinco crías (51.6%) resultaron ser positivas en el PCR para *E. bienersi*. Se encontró diez distintos genotipos de *E. bienersi* en los aislamientos de crías de alpaca, seis de los aislamientos pertenecen a nuevos genotipos (ALP1, ALP2, ALP3, ALP4, ALP5 y ALP6). Cinco crías (7.7%) fueron positivas para el genotipo P, cuatro crías (6.2%) fueron positivas para el genotipo Tipo IV, dos (3.1%) al genotipo D, una (1.5%) al genotipo BeB6, 48 (73,8%) al genotipo ALP1, y cinco crías fueron positivas para cada genotipo nuevo (ALP2, ALP3, ALP4, ALP5 y ALP6). Así mismo, cuarenta y dos muestras fueron positivas para *G. duodenalis*. Los ensamblajes A (n = 33) y E (n = 9) fueron detectados en las crías. El ensamblaje A fue el más frecuentemente en crías de Puno y Huancavelica, mientras que el ensamblaje E se encontró en 8 crías en Cuzco y uno de Huancavelica. El papel potencial de *E. bienersi* y *G. duodenalis* en el síndrome diarreico neonatal de la alpaca necesita ser seriamente considerada y evaluada, a pesar de no haber asociación entre la presencia de los parásitos y la presentación de diarrea.

Palabras claves: *Enterocytozoon bienersi*, *Giardia duodenalis*, alpaca, diarrea, zoonosis.

ABSTRACT

Enterocytozoon bieneusi and *Giardia duodenalis* are considered the most common intestinal parasites found in humans and domestic, captive and wild animals. These pathogens are responsible for causing diarrhea in immunocompromised and immunocompetent individuals. The aim of the present study was to identify *E. bieneusi* and *G. duodenalis* genotypes in fecal samples from alpaca crias. Fecal samples were collected from 126 alpaca crias up to 30 days of age from three geographic regions in the highland of Peru (Huancavelica, Cuzco and Puno). The internal transcribed spacer (ITS) region of the rRNA gene of *E. bieneusi*, and the amplification of the triosephosphate isomerase (TPI) locus of *G. duodenalis*, were amplified for a nested-PCR. All positives samples were sequenced. Sixty-five crias (51.6%) were found to be PCR positive for *E. bieneusi*. Ten distinct genotypes of *E. bieneusi* were found in alpaca cria isolates, six of all isolates belong to novel genotypes (ALP1, ALP2, ALP3, ALP4, ALP5, and ALP6). Five (7.7%) crias were positive to genotype P, four (6.2%) crias were positive to genotype Type IV, two (3.1%) to genotype D, one (1.5%) to genotype Bebb6, 48 (73.8%) to genotype ALP1, and five crias were positive each to new genotype (ALP2, ALP3, ALP4, ALP5, and ALP6). Forty-two samples were positive for *G. duodenalis*. Assemblages A (n=33) and E (n=9) were detected in crias, Assemblage A was the most frequently found in Puno and Huancavelica, while Assemblage E was found in 8 crias in Cuzco and one from Huancavelica. The potential role of *E. bieneusi* and *G. duodenalis* in the neonatal diarrhea syndrome of alpaca needs to be seriously considered and further evaluated, although had not association between the presence of parasites and diarrhea.

Key words: *Enterocytozoon bieneusi*, *Giardia duodenalis*, alpaca, diarrhea, zoonosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de una espora de microsporidio.....	6
Figura. 2. Ultraestructura de una espora microsporido.	6
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	9
Figura 4. Conceptos hipotéticos de la invasión celular de microsporidios.....	11
Figura 5. Diagnóstico de <i>Enterocytozoon bieneusi</i>	20
Figura 6. Morfología del trofozoito de <i>Giardia duodenalis</i>	25
Figura 7. Análisis filogenético del locus GDH de los sub-ensamblajes AI, AII y AIII.....	29
Figura 8. Análisis filogenético del locus GDH de los ensamblajes de <i>Giardia duodenalis</i>	31
Figura 9. Ciclo de vida de <i>Giardia duodenalis</i>	33
Figura 10. Diagnóstico de <i>Giardia</i>	45
Figura 11. Específico diagnóstico de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> median PCR anidado basados en la región ITS.....	65
Figura 12. Variación de la región ITS del gen rRNA de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> aislados de crías de alpacas.....	66
Figura 13. Asociación filogenética de genotipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> identificados en crías de alpacas y otros genotipos inscritos en el GenBank.....	67
Figura 14. Asociación filogenética de genotipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> identificados en crías de alpacas “ Grupo 1 ” (Genotipos ALP2, ALP5 y BEB6).....	69
Figura 15. Asociación filogenética de genotipos de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> identificados en crías de alpacas “ Grupo 2 ” (Genotipos ALP1, ALP3, ALP4, ALP6, TypeIV, P y D).....	69
Figura 16. Diagnóstico específico de <i>Giardia duodenalis</i> median PCR anidado basados en el gen TPI.	70
Figura 17. Asociación filogenética de ensamblajes de <i>Giardia duodenalis</i> identificados en crías de alpacas y otros genotipos inscritos en el GenBank.....	71

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Especies reconocidas en el género <i>Giardia</i> 1952-2007.....	26
Cuadro 2. Grupos genotípicos (ensamblajes) de <i>Giardia duodenalis</i> y especies basadas sobre su original descripción taxonómica.....	28
Cuadro 3. Genotipos de <i>Enterocytozoon bienersi</i> identificados en crías de alpacas por la secuencia del ITS.....	64
Cuadro 4. Relación entre <i>E. bienersi</i> y <i>G. duodenalis</i> con las variables presentación de diarrea y sexo en crías de alpacas.....	65
Cuadro 5. Ocurrencia de genotipos de <i>Giardia duodenalis</i> en crías de alpacas de Perú.....	70

LISTA DE APÉNDICE

Anexo 1. Lista actual de genotipos de <i>E. bieneusi</i>	106
Anexo 2. Manual de instrucción del FastDNA®Spin Kit for Soil.....	110
Anexo 3. Ensamblaje de <i>Enterocytozoon bieneusi</i> de alpacas inscritas en el GenBank.....	117
Anexo 4. Ensamblaje de <i>Giardia duodenalis</i> de alpacas inscritas en el GenBank.....	119

I. INTRODUCCIÓN

Enterocytozoon bieneusi y *Giardia duodenalis* son dos parásitos que pueden infectar el tracto intestinal de los seres humanos, así como una gama de animales domésticos y silvestres (Caccio y Sprong, 2010; Santin y Fayer, 2011). Por lo general, la infección se adquiere por la ingestión de la fase infecciosa del parásito, altamente resistente (esporas y quistes). La infección ocurre principalmente de manera directa, ya sea de manera fecal-oral, ingestión de alimentos contaminados o por la ingesta de agua (Thompson *et al.*, 1993; CDC, 2013). La microsporidiosis por *E. bieneusi* o la giardiasis se asocian a menudo con signos clínicos que incluyen diarrea, deshidratación, fiebre, inapetencia y anorexia. Las infecciones a menudo son autolimitantes y ocurren principalmente en individuos inmunocompetentes, llegando a ser severa y crónica en niños, ancianos e individuos inmunocomprometidos o suprimidos (Chalifoux *et al.*, 1998; Buret, 2007)

Los estudios científicos demuestran que los animales pueden estar infectados con una variedad de genotipos de *E. bieneusi* y *G. duodenalis*. Sin embargo, los estudios sugieren que el ganado de todo el mundo se encuentran infectados con al menos veinte genotipos de *E. bieneusi* y al menos tres ensamblajes (genotipos) de *G. duodenalis* (Caccio y Sprong, 2010; Santin y Fayer, 2011).

Aparentemente, parece haber diferencias respecto a la localización geográfica relacionada a los genotipos de *E. bieneusi* en el ganado. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios para poder comprobar esta hipótesis. Los estudios también

demuestran que no existe una relación con la edad del hospedador y la presencia del genotipo de *E. bieneusi* (Santin y Fayer, 2011).

Giardia duodenalis es un parásito intestinal que afecta a todos los animales domésticos y a los humanos. *Giardia duodenalis* ha sido implicado como un agente etiológico de diarreas en ganado lechero y ganado de carne en todo el mundo. Los trabajos realizados en ganado lechero en todo el mundo indican que el ensamblaje predominantemente es el “E”, y con menor grado los ensamblajes “A” y “B” (Monis *et al.*, 2009).

Se han realizados pocos estudios para determinar los genotipos de *E. bieneusi* y *G. duodenalis* en camélidos sudamericano (CSA). Actualmente, solo un genotipo es conocido para CSA, Dengjel *et al.*, (2001) reportaron el genotipo P de *E. bieneusi* para una llama adulta de un zoológico de Alemania. Así mismo, los estudios moleculares realizados en CSA indican que ellos pueden ser infectados con el ensamblaje A y E de *G. duodenalis*, con una prevalencia que puede llegar hasta un 50% (Trout *et al.*, 2008; Gómez-Couso *et al.*, 2012).

Para el presente estudio, la región espaciador transcrito interno (ITS) y el gen triosa fosfato isomerasa (TPI) fueron seleccionados para la identificación genética y caracterización molecular de *E. bieneusi* y *G. duodenalis*, respectivamente. Ambos han sido ampliamente utilizados para la caracterización de las especies y genotipos/subgenotipos de estos dos parásitos en los seres humanos y otros animales (Sulaiman *et al.*, 2003a, 2003b; Lobo *et al.*, 2006; Trout *et al.*, 2008; Xiao y Fayer, 2008; Santin y Fayer, 2011.). El presente estudio se realizó con el objetivo de caracterizar genéticamente los genotipos de *E. bieneusi* y *G. duodenalis* en crías de alpacas provenientes de los departamentos de Cuzco y Puno.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1. *Enterocytozoon bienersi*

1.1. Introducción

Los microsporidios (Microsporidia) son organismos unicelulares obligatoriamente intracelulares, fueron conocidos y reportados por primera vez como el agente causante de la “enfermedad de la pimienta” (pebrine disease o pepper disease). Esta enfermedad casi destruye la industria del gusano de seda a mitad del siglo XIX, y desde entonces, han causado importantes pérdidas económicas en la apicultura para producción de miel y en la industria pesquera (Franzen, 2008; Wittner, 1999). Las primeras infecciones por microsporidios en mamíferos fueron reportados en el conejo en 1922 por Wright y Craighead (Wright y Craighead, 1922). Actualmente, se sabe que los microsporidios infectan comúnmente los animales de laboratorio, los animales de granja y animales domésticos (Weber *et al.*, 1994; Didier *et al.*, 1998; Snowden *et al.*, 1998). El primer caso documentado de microsporidiosis en humanos fue publicado en 1959, esto ocurrió en un niño de nueve años de edad, con dolores de cabeza, fiebre y convulsiones (Matsubayashi *et al.*, 1959). La microsporidiosis fue notificada raras veces en los seres humanos hasta que la pandemia del SIDA se desarrolló, y desde 1985, ha sido reconocida como una infección oportunista asociada con diarrea persistente en individuos inmunocomprometidos, especialmente en personas con SIDA y los receptores de trasplante de órganos. Actualmente, la enfermedad “diarrea del viajero” en adultos y niños ha sido debido a microsporidios, lo que sugiere que estas infecciones pueden ser más comunes de lo que actualmente se han reportado (Schwartz y Bryan, 1999).

Existen aproximadamente 1200 especies de microsporidios que infectan a invertebrados y vertebrados (Wittner, 1999). La mayoría de especies de microsporidios infectan artrópodos y peces, pero 15 especies de microsporidios son actualmente conocidos por infectar a mamíferos. *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, y *Encephalitozoon hellem* son los microsporidios con mayor frecuencia en mamíferos incluyendo al humano (Wright y Craighead, 1922; Weber *et al.*, 1994; Wittner, 1999). *Enterocytozoon bieneusi* es el microsporidio más común reportado para mamíferos no humanos. Lo peculiar de este enteropatógeno es el de poseer múltiples genotipos (Mathis *et al.*, 2005).

Enterocytozoon bieneusi pueden infectar hospedadores de todas las edades. No obstante, generalmente los jóvenes se infectan con mayor frecuencia que los adultos. Los signos clínicos que ocasionan pueden variar dependiendo de la edad y estado de salud del hospedador, así como el origen genético y la dosis infectiva (Desportes *et al.*, 1985; Didier *et al.*, 1998; Didier, 2005; Thellier y Breton, 2008).

1.2. Biología

1.2.1. Estatus taxonómico y filogenia

En 1857, Nagëli clasificó el primer microsporidio, *Nosema bombycis*, dentro de la clase Schizomycetes, que en ese momento incluía también a las levaduras y bacterias. En 1882, Balbiani definió el orden de Microsporidia, y en 1976, Sprague separa los microsporidia en el filo Microspora, dentro del reino animal Protozoa. En 1998, Cavalier-Smith transfiere los microsporidia dentro del reino Fungi (Cavalier-Smith, 1998; Wittner, 1999).

La clasificación taxonómica de los microsporidios fueron hechas en base de sus hospedadores definitivos y las características ultraestructurales, tales como el tamaño de los organismos, desarrollo y madurez, disposición núcleo (monocariote o diplocariote), número de bobinas de filamentos polares, la interfaz con la célula huésped durante el desarrollo y el modo de la célula y la división nuclear (división binaria, con cariocinesis citocinesis retraso) (Didier *et al.*, 1998; Wittner, 1999). Posteriormente, métodos de biología molecular han sido utilizados para clasificar los

microsporidios, y en 1986, Vossbrinck y sus colegas informaron que los microsporidios eucariota poseen ribosomas muy parecidos a los procariotas, debido a que los genes ribosomales codifican las subunidades 16S y 23S, independientemente a la subunidad 5.3S, tal como se observa típicamente en eucariotas (Vossbrinck *et al.*, 1987; Weiss y Vossbrinck, 1999).

Edlind *et al.* (1996), reportaron que las secuencias de los genes α -tubulina y β -tubulina, de los microsporidio, estaban más estrechamente relacionados con los hongos que con los protozoos. Así mismo, las secuencias del gen mitocondrial HSP70 para los microsporidios, *Varimorpha necatrix* y *Nosema locustae*, se identificaron y se encontró que estaban más estrechamente relacionados con las secuencias del gen HSP70 de hongos que de protozoos (Germot *et al.*, 1997; Germot y Philippe, 1999). Estos hallazgos sugieren que los microsporidios están estrechamente relacionados con los hongos, y son organismos eucariotas (Embley y Hirt, 1998).

Actualmente las especies *E. bieneusi* presentan una sub nomenclatura molecular con respecto a sus genotipos. Los genotipos de *E. bieneusi* (Thellier y Breton, 2008; Santin y Fayer, 2009) no presentan ningún estado taxonómico, únicamente esta información es valiosa en la identificación genética de organismos para los cuales la biología limite la información.

El estatus taxonómico de *E. bieneusi*, que actualmente es válido para la especie, es la siguiente:

Filo: Microspora (Sprague, 1977)
Clase: Microsporea (Delphy, 1963)
Orden: Microsporida (Balbiani, 1882)
Familia: Enterocytozoonidae (Cali & Owen, 1990)
Género: *Enterocytozoon* (Desportes *et al.*, 1985)
Enterocytozoon bieneusi (Desportes *et al.*, 1985)

1.2.2. Morfología

Hay dos fases en el desarrollo de microsporidios: una fase de proliferación (merogonia), la cual ocurre dentro de la célula huésped y una fase esporogónica (esporogonia), en la cual los esporontes producen los esporoblastos, ellos maduran para la formación de esporas. Las esporas son la única etapa de los microsporidios fuera de la célula huésped (Vavra y Larsson, 1999).

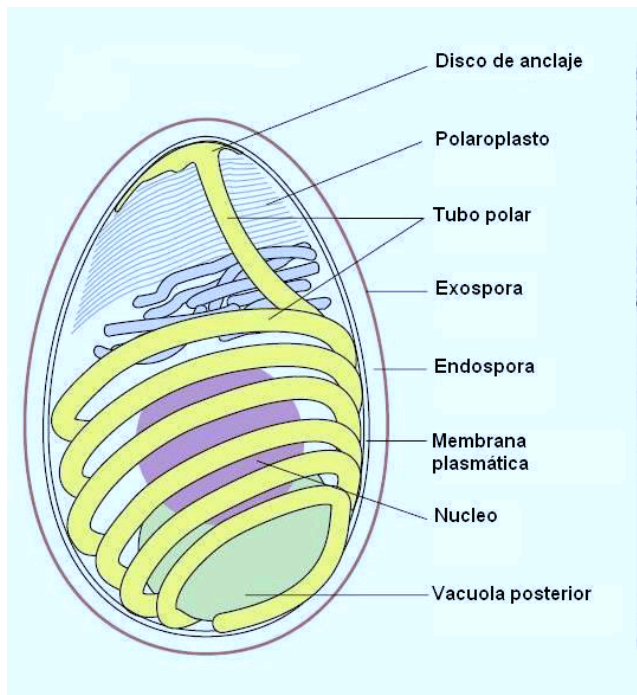


Figura 1. Diagrama de una espora de microsporidio (Franzen, 2005).

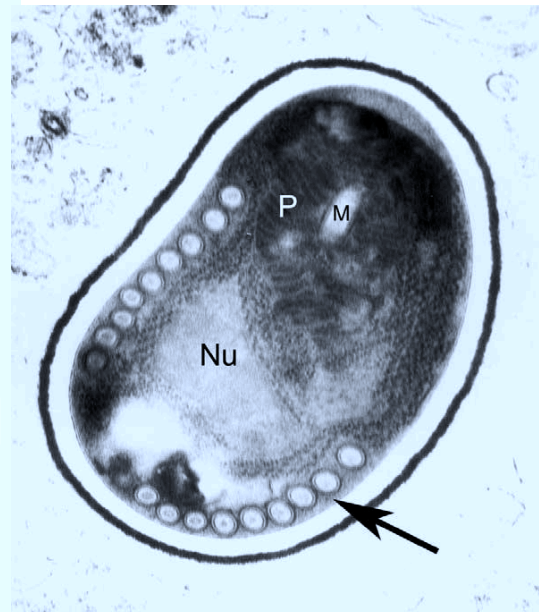


Figura. 2. Ultraestructura de una espora microsporidio. Microfotografía electrónica de transmisión de una espora demostrando el tubo polar en sección transversal (flecha) (Xu y Weiss, 2005).

La fase infecciosa de los microsporidios es la espora, y las especies que se presentan en mamíferos son pequeñas y de forma ovalada, de unos 1,0-3,0 μm 1,5-4,0 μm (Vavra y Larsson, 1999). Las esporas de *E. bienersi* y la mayoría de las especies de microsporidios, son resistentes al medio ambiente. Están rodeadas por una capa externa compuesta de glicoproteína, una endospora compuesta de quitina y una membrana plasmática interna. El núcleo de los microsporidios puede ser como monocarionte (un solo núcleo), como se observa en las especies de *Encephalitozoon*, *Enterocytozoon*, *Pleistophora* y *Trachipleistophora*, o como diplocarionte (con dos núcleos adosados

que funcionan como una sola unidad), como se observa en las especies de *Brachiola*, *Nosema*, y *Vittaforma* (Didier *et al.*, 2004). Las esporas maduras contienen una vacuola en la región posterior, y en la región anterior contiene un disco de anclaje, así como atípicos aparato de Golgi denominados polaroplastos (Fig. 1 y 2) (Vavra y Larsson, 1999; Didier *et al.*, 2004). El filamento polar es una estructura única de los microsporidios, es un tubo hueco que se produce desde el disco de anclaje, que se va enrollándose en la región medio-posterior de la espora. Con un cambio en el pH o la presión osmótica, la vacuola posterior y el polaroplasto se hinchan debido a la absorción de agua, ejerciendo presión para inducir la eversión del filamento polar (Undeen, 1990; Keohane y Weiss, 1999).

1.2.3. Genotipos

Los genotipos de *E. bienewsi*, actualmente están divididos en cinco grupos principales, numerados del 1 al 5 (Thellier y Breton, 2008; Santin y Fayer, 2009). El Grupo 1 es el grupo más grande y alberga principalmente a genotipos de humanos y cerdos. En este grupo también se incluyen algunos genotipos reportados para gatos y animales silvestres. El único genotipo conocido para camélidos sudamericanos es llamado genotipo P, este fue reportado de una llama adulta de un zoológico de Alemania y también está incluida en el grupo 1 (Dengjel *et al.*, 2001; Sulaiman *et al.*, 2004).

Los Grupos 2, 3 y 4 de *E. bienewsi*, están conformados por genotipos exclusivos para animales. El Grupo 2 alberga a 10 genotipos reportados sólo en ganado y uno encontrado en pollo (Dengjel *et al.*, 2001; Reetz *et al.*, 2002; Santin *et al.*, 2004; Fayer *et al.*, 2007). El Grupo 3 está conformado por genotipos de gato y de la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*) (Sulaiman *et al.*, 2003; Lobo *et al.*, 2006b) y en el Grupo 4 están incluidos genotipos propios para el mapache (*Procyon lotor*) (Sulaiman *et al.*, 2003). Por último, en el Grupo 5 se tiene a 2 genotipos, uno reportado para humanos en Camerún y el otro para primates del nuevo mundo, del genero *Callithrix* (ver Anexo 1) (Lobo *et al.*, 2006b; Breton *et al.*, 2007).

1.2.4. Ciclo de Vida

Las infecciones en los mamíferos, generalmente ocurren después de la ingestión o inhalación de esporas de microsporidios. Sin embargo, algunos microsporidios como *E. cuniculi* ha demostrado tener transmisión transplacentaria, ha sido reportado en carnívoros, especialmente en zorros y en perro doméstico, ocasionalmente en los primates no humanos, caballos, conejos y roedores, pero no ha sido reportado en humanos (Didier *et al.*, 1998; Didier *et al.*, 2005). Las infecciones por microsporidios también se han transmitido a los seres humanos por un traumatismo o por contacto directo. Existen reportes que la microsporidiosis ha sido transmitida a los animales de laboratorio por inoculación intraperitoneal, intravenosa, intrarectal, intratraqueal e intracerebral (Shadduck y Orenstein, 1993; Weber *et al.*, 1994; Snowden *et al.*, 1998). El sitio inicial o primario de la infección depende de la vía de transmisión, y por lo general se produce en las células epiteliales de los tractos gastrointestinal o respiratoria. Después de la germinación y la infección de las células huésped, los organismos se multiplican durante merogonia y se diferencian en las esporas durante esporogonia (Didier *et al.*, 1998).

E. bienewsi es la única especie asignada al género, *Enterocytozoon*, que parasita a los mamíferos. Estos organismos se desarrollan en contacto directo con el citoplasma de la célula huésped (Desportes *et al.*, 1985; Cali y Owen, 1990; Cali y Takvorian, 1999; Vavra y Larsson, 1999). Las etapas iniciales sufren una división nuclear para generar plasmodios merogonial multinucleados que contienen hendiduras electro-lúcidas. Durante la esporogonia, las organelas desarrollan filamentos polares alrededor de cada núcleo en el plásmido esporogonial. Las infecciones primarias por *E. bienewsi* se dan en las células endoteliales del intestino delgado y de la vesicular biliar, las esporas maduras son liberadas al lumen intestinal y eliminadas en las heces de los hospederos (Kotler y Orenstein, 1998; Kotler y Orenstein, 1999). Las esporas maduras de *E. bienewsi* poseen un solo núcleo, contienen un filamento polar que se enrolla aproximadamente seis veces en una alineación de dos hileras, y son los más pequeños de los microsporidios, midiendo aproximadamente 1,0 x 1,5 micras (Fig. 3) (Desportes *et al.*, 1985).

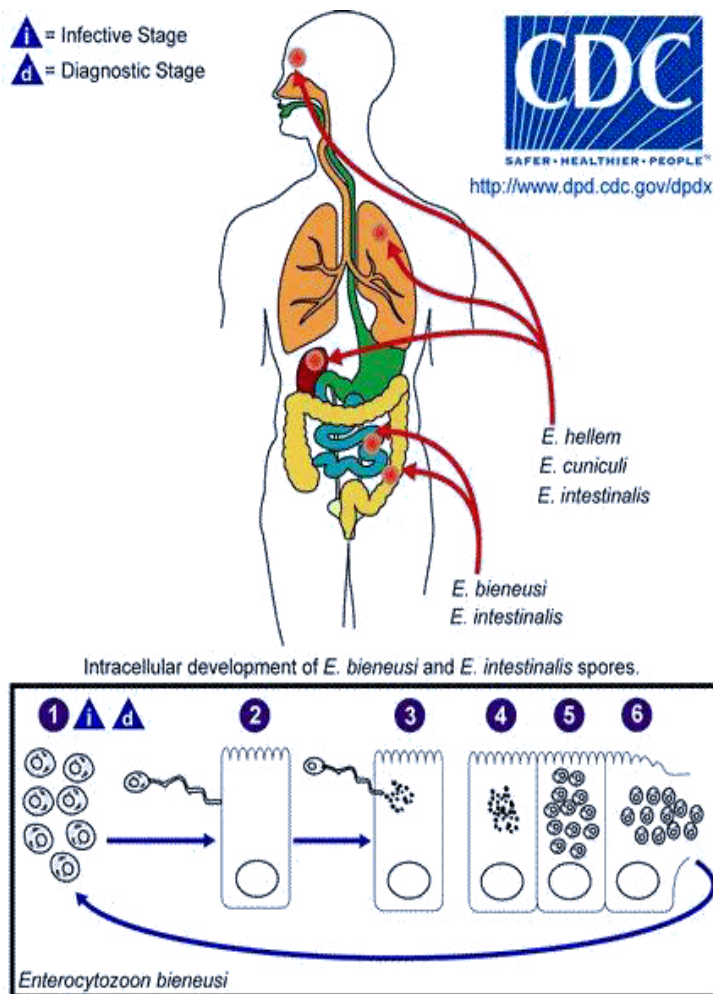


Figura 3. Ciclo de vida de *Enterocytozoon bieneusi*. La forma infecciosa de los microsporidios es la espora, que puede sobrevivir durante largo tiempo en el medio ambiente (1). La espora expulsa su túbulo polar e infecta a la célula hospedera (2). La espora inyecta el esporoplasma en la célula eucariótica hospedera a través del túbulo polar (3). Dentro de la célula, el esporoplasma sufre multiplicación extensa ya sea por merogonia (fisión binaria) o esquizogonia (fisión múltiple) (4). Este desarrollo ocurre en contacto directo con el citoplasma de la célula hospedera. Ya sea libre en el citoplasma o en el interior de una vacuola parasitófora, los microsporidios se desarrollan por esporogonia en esporas maduras (5). Durante la esporogonia, una pared gruesa se forma alrededor de la espora, que proporciona resistencia a las condiciones ambientales adversas. Cuando las esporas aumentan en número y llenan completamente el citoplasma de la célula huésped, la membrana celular se rompe y libera las esporas a los alrededores (6). Estas esporas maduras libres pueden infectar nuevas células continuando así el ciclo (CDC, 2013).

1.2.5. Invasión celular

A principios del siglo XIX, fue reconocida por primera vez las funciones del filamento polar para llevar a cabo la esporoplasma a una nueva célula huésped. Desde entonces, se han propuesto varias teorías que participan en el mecanismo de la salida del esporoplasma de la espora y la función del filamento polar en este proceso (Dissanaïke y Canning, 1957; Weiser, 1959; Huger, 1960; David y Weiser, 1993). Antiguamente se pensaba que el filamento polar era una organela sólida, con el esporoplasma adjunto. Actualmente, la teoría más aceptada es que el filamento polar, primero enrollado en masa, se desenrolla arrastrando a la esporoplasma de la espora dentro de la célula hospedera (Fig. 4) (Dissanaïke y Canning, 1957; Franzen, 2008).

La naturaleza tubular del filamento polar fue propuesta por Morgenthaler en 1922, tras la observación de la aparición de una masa fluida en la punta del filamento polar extruido de *Nosema apis* (Morgenthaler, 1922; Franzen, 2008). Esta observación fue confirmada más tarde por Oshima, quien sugirió que el esporoplasma de las esporas pasan a través del filamento hueco polares formados durante la descarga en las células epiteliales del intestino del insecto (Ohshima, 1937). Kudo y Daniels confirmaron finalmente la naturaleza tubular del filamento polar (Kudo y Daniels, 1963), y Kramer observó que el esporoplasma de un microsporidio pasa a través de un tubo polar extruido (Kramer, 1960), lo cual fue confirmado más tarde por otros investigadores (West, 1960; Lom y Vávra, 1963). En 1962, Lom y Vávra presentaron la primera película de extrusión de filamento polar y el paso del esporoplasma a través del filamento. Este proceso único fue estudiado por Albert Undeen, quien contribuyó con resultados significativos en el fenómeno de extrusión del filamento polar de los microsporidio (Undeen y Avery, 1988; Undeen, 1990; Undeen y Frixione, 1991a, b). Así mismo, Earl Weidner desde la década de 1970 contribuyó con una lista amplia de trabajos científicos que tratan sobre el filamento polar de los microsporidio, la invasión en las células, y desarrollo intracelular de los microsporidios (Weidner, 1976, 1982; Weidner y Byrd, 1982; Pleshinger y Weidner, 1985; Weidner y Sibley, 1985).

A pesar que la función y el mecanismo de extrusión del tubo polar han sido reconocidos hace más de 100 años, y del conocimiento sobre la composición y función de este órgano se ha incrementado notablemente durante los últimos años, aun no está bien claro como el tubo polar penetra en la membrana de la célula hospedera (Keohane y Weiss, 1999; Xu y Weiss, 2005). El tubo polar tiene un diámetro muy estrecho, mide de 0,1 a 0,2µm, y es emitido a partir de la espora con una fuerza considerable. Inicialmente, se divulgó que el tubo polar penetra en la membrana plasmática de la célula huésped nueva, como si fuera una aguja hipodérmica para inyectar el esporoplasma en el citoplasma del hospedador (Fig. 2) (Keohane y Weiss, 1999).

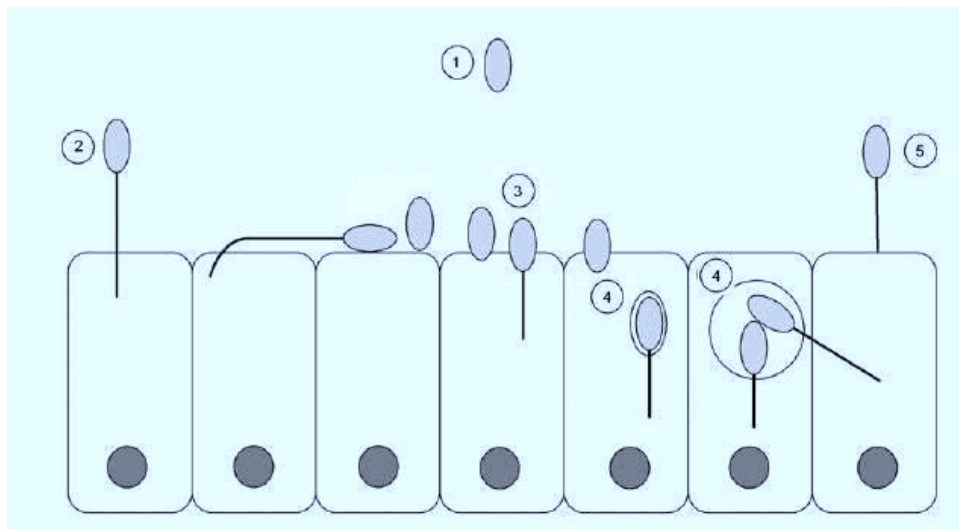


Figura 4. Conceptos hipotéticos de la invasión celular de microsporidios. 1. Esporas de microsporidios libre. 2. Perforación de la membrana de la célula huésped por el tubo polar extruido y la inyección de la esporoplasma en la célula huésped. 3. Perforación de la membrana de la célula huésped por el tubo polar extruido y la inyección de la esporoplasma en la célula huésped después de la interacción entre la espora microsporidios y la membrana celular y el inicio de la endocitosis de la espora. 4. La infección secundaria, a partir de la vacuola parasitófora, o desde el citoplasma de la célula, de la misma o de una celda adyacente a través del tubo polar. 5. Fagocitosis del tubo polar previamente extruido (Franzen, 2005).

Estudios recientes utilizando *Encephalitozoon* spp., han indicado que el tubo polar puede entrar en las células nuevas de acogida por un proceso casi fagocítico sin destruir la membrana de la célula huésped. El posible desarrollo de este proceso de penetración se puede ver por microscopia electrónica en la exploración de *Encephalitozoon* spp., incluyendo el túnel de invaginación ocasionado por la penetración del tubo polar (Magaud *et al.*, 1997; Schottelius *et al.*, 2000; Bigliardi y Sacchi, 2001). Otro esquema se ha sugerido para la entrada de los microsporidios (*E. intestinalis*) en los fagocitos no profesionales (células Caco-2), implican una interacción específica entre el polo posterior de la espora microsporidio y la membrana celular, la extrusión del tubo polar, y fagocitosis inducida de la esporoplasma dentro de una célula hospedera (Foucault y Drancourt, 2000). Por el contrario, otros estudios sugieren que el proceso de fagocitosis se produce por el contacto de la espora ápice con la membrana de la célula huésped (Magaud *et al.*, 1997). Sin embargo, no existe evidencia de endocitosis mediada por receptores. Por lo tanto, la extensión del tubo polar también puede ser una adaptación para permitir a la espora no móvil, interactuar con las células diana más o menos lejana. En la actualidad, la mayoría de estos conceptos siguen siendo

hipotéticos y debe ser verificada debido a que es difícil distinguir si un tubo polar que descarga su material en una célula hospedera (Magaud *et al.*, 1997; Foucault y Drancourt, 2000).

Bajo condiciones experimentales en cultivos de células, las esporas de muchos microsporidios entrar en el citoplasma de internalización de las esporas sin necesidad del tubo polar (Weidner, 1982). Esta absorción puede ser inhibida por citocalasina D, lo que sugiere que la entrada de las esporas en las células está mediada por fagocitosis dirigida, dependiente de actina. Se ha demostrado que las esporas dentro de los compartimentos lisosomales se digieren rápidamente, sin embargo, algunos esporoplasmas logran escapar de los lisosomas y pueden infectar el citoplasma de las células huésped vecina por la descarga del tubo polar. El esporoplasma de estas esporas y las esporas que se inyecta el tubo polar desde fuera de las células parecen ser la única fuente para el establecimiento de un nuevo ciclo de vida de los microsporidios dentro de las células. El origen de esta vacuola parasitófora todavía no está claro (Fig. 3). Conceptos similares se han sugerido en estudios anteriores (David y Weiser, 1993; Keohane y Weiss, 1999), pero la evidencia experimental se ha logrado recientemente (Franzen, 2004, 2005; Franzen *et al.*, 2005).

1.3. Epidemiología

El microsporidio *E. bienewsi* tienen una distribución mundial y se puede encontrar en una amplia lista de mamíferos como hospedadores (Franzen, 2008; Santin y Fayer, 2009). Desde su descubrimiento, ha sido relacionada con enfermedad gastroentericas, principalmente diarrea, en hospedadores inmunosuprimidos, principalmente humanos (Franzen, 2008).

Un factor de riesgo asociado de manera consistente con la microsporidiosis en los estudios epidemiológicos, es el contacto con el agua (Hutin *et al.*, 1998; Dascomb *et al.*, 2000). Algunas de las especies de microsporidios que infectan a animales y a los seres humanos, incluyendo a *E. bienewsi*, *E. intestinales* y *B. algerae*, han sido identificados en aguas subterráneas, superficiales, zanja, y de riego de cultivos (Avery y Undeen, 1987; Sparfel *et al.*, 1997; Dowd *et al.*, 1998; Fournier *et al.*, 2000; Fournier

et al., 2002; Thurston-Enriquez *et al.*, 2002). Además, se han identificado esporas de *E. bienewsi* en heces de animales que se relacionan estrechamente con las aguas superficiales (Sulaiman *et al.*, 2003). Así mismo, se observó un aumento de la frecuencia de microsporidiosis entre las personas que viven cerca de los subsistemas de distribución de agua en Francia (Cotte *et al.*, 1999). Otro factor importante en la epidemiología y modo de transmisión del *E. bienewsi* es la falta de especificidad del hospedador (Franzen y Muller, 1999).

Los datos sobre las características epidemiológicas de la microsporidiosis están aumentando rápidamente, pero aún quedan muchas preguntas sin respuesta. Las estimaciones fiables sobre prevalencia de la enfermedad no está bien documentada, debido a que casi todos los estudios publicados no se basan en muestras verdaderamente al azar sino que se refieren a poblaciones de pacientes muy seleccionados, tales como pacientes infectados por VIH con diarrea crónica (Mathis *et al.*, 2005). Diferentes métodos de diagnóstico, diseño de los estudios no controlados y no aleatorios, así como numerosas especies con diversas manifestaciones clínicas hacen que sea muy difícil entender la verdadera carga de la microsporidiosis. Los estudios sobre *E. bienewsi* en pacientes con SIDA con diarrea crónica han descrito prevalencias entre el 4% y 50%, dependiendo del grupo de estudio y el método de diagnóstico. En conjunto, estos estudios han evaluado más de 2500 pacientes y se confirmó unos 500 casos de infección por *E. bienewsi* (20%) y el número total de casos reportados supera los 1000 (Mathis *et al.*, 2005; Franzen, 2008).

Once años después de su descubrimiento como un patógeno humano, *E. bienewsi* fue por primera vez detectado en animales (cerdos) (Deplazes *et al.*, 1996), y estudios posteriores han confirmado la presencia de *E. bienewsi* en cerdos y terneros, con una alta prevalencia (Breitenmoser *et al.*, 1999). El parásito también se ha detectado en gatos, perros, cabras, llama y una gran variedad de especies de mamíferos silvestres (Mathis *et al.*, 2005; Franzen, 2008).

Cuarenta y uno de los diferentes genotipos de *E. bienewsi* infectan a animales domésticos, pero existe poca información sobre la distribución geográfica de los

genotipos de origen animal y humano (Santin y Fayer, 2009). Solamente ocho genotipos parecen tener un potencial zoonótico, debido a que han sido descubierto en hospederos vertebrados con aparente grado de especificidad, además de presentar la misma caracterización molecular en los aislados de animales y humanos (Sulaiman *et al.*, 2003; Lobo *et al.*, 2006a; Lobo *et al.*, 2006b; Cama *et al.*, 2007; Santin y Fayer, 2011).

1.3.1. Prevalencia y distribución geográfica

La infección por *E. bienewsi* en humanos y animales se produce por todo el mundo, pero los datos de prevalencia varían ampliamente debido a la falta de fiabilidad de los métodos de detección (Bryan y Schwartz, 1999). Antes de la pandemia del SIDA, la microsporidiosis fue raramente identificada en el hombre (Kotler y Orenstein, 1998; Didier *et al.*, 2004). Los datos de prevalencia de microsporidiosis en las poblaciones humanas antes de la era del SIDA se basó en pruebas serológicas para la detección de anticuerpos de *E. cuniculi*. *E. cuniculi*, fue el único microsporidio de mamíferos que podían ser cultivados *in vitro* y ofrecer antígenos necesarios para los ensayos. Los estudios de seroprevalencia indicaban rangos de 0 a 42% con tasas más altas en hombres homosexuales en Suecia y en personas con otras infecciones parasitarias (Hollister y Canning, 1987; Hollister *et al.*, 1991; Didier *et al.*, 2004). Retrospectivamente, la interpretación de estos resultados serológicos se limita ahora que se conoce nuevas especies de microsporidios, incluyendo *E. bienewsi* que aún no se puede mantener en cultivo *in vitro* y así generar cantidades suficientes de antígeno necesario para las pruebas serológicas (Didier *et al.*, 1998). Además, las personas con otras infecciones parasitarias presentan una activación policlonal de los linfocitos, conduciendo a la expresión de anticuerpos de reacción cruzada y resultados falsos positivos para microsporidios. Recientemente se han realizados estudios serológicos para la detección de anticuerpos específicos contra microsporidios en individuos VIH-seronegativos, como los donantes de sangre, trabajadores de mataderos, criadores de perros, trabajadores forestales, y las mujeres embarazadas. Estas tasas de seroprevalencia oscilaban entre 1,3 a 8,0% (van Gool *et al.*, 1997; Kucerova-Pospisilova y Ditrich, 1998; del Aguila *et al.*, 2001).

Las pruebas serológicas son poco fiables en personas con inmunodeficiencia por el VIH, por lo que los estudios de prevalencia en estos individuos se han basado en la detección directa de los organismos. Estudios realizados indican que la mayoría de estas personas estaban infectadas con *E. bienewsi* con tasas de prevalencia que van desde 5 a 50%, variando según la ubicación geográfica y las técnicas de diagnóstico (Deplazes *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2000). Basado en la evaluación de estos estudios, Bryan y Schwartz (1999) sugiere una prevalencia aproximada global de microsporidiosis en un 15% de los pacientes con SIDA (Bryan y Schwartz, 1999).

1.3.2. Fuentes de infección y modo de transmisión

La microsporidiosis por *E. bienewsi*, es una infección emergente y relativamente poco conocida. Solo se han realizado pocos estudios para determinar el origen y el modo de transmisión. Actualmente existen reportes de casos individuales de microsporidiosis en humanos, así como infecciones naturales y experimentales en animales. Estos estudios han proporcionado información acerca de los probables modos de transmisión de los microsporidios a los seres humanos (Shadduck *et al.*, 1996; Deplazes *et al.*, 2000). Las observaciones que los microsporidios son ubicuos en la naturaleza y que las infecciones se producen en todo el mundo sugieren que existen varios mecanismos de transmisión y reservorios para las infecciones humanas (Didier *et al.*, 2004).

1.3.2.1. Humanos (Transmisión vertical y Horizontal)

La transmisión vertical de la microsporidiosis de madre a hijo se ha descrito en roedores, conejos, carnívoros y en primates no humanos (Snowden *et al.*, 1998; Snowden y Shadduck, 1999). La transmisión vertical de microsporidiosis en los seres humanos aún no ha sido documentada (Didier *et al.*, 2004).

La presencia de microsporidios en el tracto respiratorio e intestinal de los individuos infectados; así como la excreción de esporas en la orina y las heces indican que la transmisión horizontal es posible a través de rutas que incluyen la transmisión fecal-oral, la transmisión oral-oral, la inhalación de aerosoles contaminados, y la ingestión de alimentos y agua contaminados (Bryan y Schwartz, 1999; Deplazes *et al.*,

2000; Mota *et al.*, 2000; Weber *et al.*, 2000). Los factores de riesgo asociados con la transmisión horizontal incluye las prácticas homosexuales, el uso de drogas por vía intravenosa, y la exposición al agua de las piscinas y bañeras de agua caliente, así como el contacto profesional con agua (Hutin *et al.*, 1998; Dascomb *et al.*, 2000; Didier *et al.*, 2004).

Experimentalmente, los animales pueden ser infectados con *E. bienewsi*, *Encephalitozoon* sp., y *B. algerae* por la alimentación oral, inoculación intrarrectal o mediante la administración de los organismos sobre el ojo, respectivamente (Fuentealba *et al.*, 1992; Tzipori *et al.*, 1997; Koudela *et al.*, 2001), estos reportes apoyan a la probabilidad de que la transmisión horizontal pueda ocurrir en humanos.

1.3.2.2. Animales (Potencial zoonótico)

La transmisión zoonótica de *E. bienewsi* sigue sin estar claro. Sin embargo, se han identificado a una amplia gama de animales que son reservorios de genotipos de *E. bienewsi* que son reportados en humanos (Santin y Fayer, 2011). Un estudio encontró una cantidad inusual de genotipos de *E. bienewsi* en siete cobayos y un niño de 2 años provenientes el mismo hogar. Esta particularidad genética del parásito, así como su gran incidencia en otros cobayos de la comunidad, sugieren la posibilidad de transmisión zoonótica de la infección al niño a estudiar (Cama *et al.*, 2007).

Muchas especies de microsporidios que infectan a los humanos, pueden infectar a una amplia variedad de animales, esto apoya a la probabilidad de que ocurra la transmisión zoonótica. Bajo condiciones experimentales, las esporas de microsporidios permanecen viables en el agua, incluso después de la desecación y en diferentes temperaturas. Esta resistencia de las esporas sugiere que la transmisión indirecta de los microsporidios zoonóticos podría ocurrir entre animales y humanos a través de la exposición al agua contaminada, los alimentos o los aerosoles (Bryan y Schwartz, 1999; Didier *et al.*, 2004).

1.3.2.3. Agua (Transmisión por agua)

Las esporas de los microsporidios que infectan a los humanos y animales pueden ser excretados fácilmente con la orina y las heces, y de ese modo contaminar suministros de agua. Las esporas de microsporidios son resistentes al medio ambiente y pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en el agua. Así mismo, las esporas son relativamente pequeñas y no son atrapados fácilmente por filtración, esto puede favorecer a la infección debido a que la dosis infecciosa es probablemente bastante bajo (Franzen y Muller, 1999). Muchas especies de microsporidios que infectan a los seres humanos se han identificado en diversas fuentes de agua incluyendo las aguas subterráneas, superficiales y zanjas. Las esporas de *E. bienewsi* se han identificado en heces de animales silvestres (castores) que están estrechamente relacionados con el agua superficial. En los estudios epidemiológicos, los factores de riesgo asociados con microsporidiosis humana incluyen la exposición a aguas recreativas, baños calientes, aguas tratadas y agua potable (Hutin *et al.*, 1998; Dascomb *et al.*, 2000), el aumento de las tasas de infección se asoció con la gente que vive cerca de los subsistemas de distribución de agua (Cotte *et al.*, 1999).

1.3.2.4. Alimento (Trasmisión por alimento)

Los microsporidios se encuentran en la lista de parásitos transmitidos por alimentos, esto debido a la globalización de los alimentos, transporte de los alimentos, aumento de los viajes de los consumidores, y los cambios en los patrones de consumo de alimentos (Slifko *et al.*, 2000; Orlandi *et al.*, 2002a; Orlandi *et al.*, 2002b).

En un estudio epidemiológico reciente, comer carne poco cocida al menos una vez al mes se asociaba con la microsporidiosis en individuos infectados por el VIH (Hutin *et al.*, 1998). Buckholt *et al.*, (2002) identificó esporas de *E. bienewsi* en cerdos en un matadero en Massachusetts, EE.UU., esto sugiere que una pobre cocción de la carne puede tener la probabilidad de transmitir la microsporidiosis (Buckholt *et al.*, 2002).

1.3.2.5. Artrópodos (Transmisión por vectores)

También existe evidencia que implica la transmisión por vectores para la microsporidiosis. *Brachiola* (sin. *Nosema*) *algerae*, es un patógeno natural de los mosquitos, no causa infecciones sistémicas en las ratas o los ratones después de las inoculaciones por vía intravenosa u oral, pero las infecciones localizadas se desarrolló después de la inoculación subcutánea en la cola, los pies o las orejas (Undeen y Alger, 1976; Trammer *et al.*, 1997). Esto sugiere que el crecimiento de *B. algerae* se limitó a temperaturas por debajo de 37 °C. Por otro lado, *B. algerae* fue identificado y aislado de la córnea de un individuo inmunocomprometido, y adaptadas a temperaturas de 37 °C (Moura *et al.*, 1999; Lowman *et al.*, 2000).

Actualmente, se conoce a una especie de *Enterocytozoon*, *Enterocytozoon hepatopenaei*, capaz de infectar el langostino (*Penaeus monodon*) (Tourtip *et al.*, 2009), sin embargo, hasta la fecha no se han reportado infecciones en mamíferos por esta especie. En un estudio epidemiológico, uno de los factores de riesgo asociados con microsporidiosis en individuos infectados por VIH fue el haber sido picado por una abeja, avispa o avispon, este estudio apoya la posibilidad de transmisión por vectores (Dascomb *et al.*, 2000).

1.4. Lesiones

En los humanos, *E. bienewsi* infectan principalmente los enterocitos del intestino delgado (yeyuno y el duodeno) y las células epiteliales de las vías biliares. En los enterocitos, los organismos se replican en la región supranuclear y por lo general hacen que el núcleo de la célula huésped se deforme o deslice. La replicación del *E. bienewsi* se asocia con la pérdida de las vellosidades de los enterocitos, atrofia de las vellosidades (aplanamiento), mala absorción de la D-xilosa, hiperplasia de las criptas, infiltración de células mononucleares, y la disminución de la actividad de las disacaridasas intestinales (Weber *et al.*, 1994; Kotler y Orenstein, 1998; Kotler y Orenstein, 1999).

En las heces de los pacientes con SIDA que se encuentran infectados con microsporidiosis, se detecta en niveles relativamente altos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y una citoquina inflamatoria, y se presume que estos cambios estén

asociada con microsporidiosis en pacientes con SIDA (Sharpstone *et al.*, 1997). En el primates no humano “Macaco Rhesus” (*Macaca mulatta*), infectados naturalmente o experimentalmente con *E. bienewisi*, los organismos infectan principalmente la vesícula biliar y vías biliares. Las lesiones causadas son la hiperplasia del epitelio biliar, infiltración de células mononucleares y fibrosis periportal (Chalifoux *et al.*, 1998; Mansfield *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2004).

1.5. Diagnóstico

Los microsporidios son todavía difíciles de diagnosticar, a pesar de los grandes avances moleculares para el diagnóstico realizados en la última década. El diagnóstico de microsporidiosis en los vertebrados depende del estado inmunológico de la especie hospedadora, así como del microsporidio infestante. Por ejemplo, los conejos de laboratorio inmunológicamente sanos, roedores, y en algunos perros, se puede hacer el descarte de *E. cuniculi* mediante pruebas serológicas como ELISA, así como inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de anticuerpos. Sin embargo, las infecciones por microsporidios en animales inmunodeficientes, que no tienen una buena respuesta inmunológica a la infección, debe basarse en otros métodos de diagnóstico. Uno de los métodos de diagnóstico es la histopatología, en esta técnica se emplea colorantes especiales como colorante Gram Browns & Hopps, tinción tricrómica modificada y tinción de PAS (Gardiner *et al.*, 1998). La presencia de esporas de microsporidios en heces, orina y líquido cefalorraquídeo pueden ser detectados por microscopía de campo claro, después de la tinción con tricrómico modificado y la tinción de Gram-cromotropo, así como por microscopía de fluorescencia (IFA) después de la tinción con calcofluor o Uvitex 2B (Fig. 5) (para detectar la quitina en la pared de las esporas) o por fluorescente hibridación in situ (FISH) (Didier *et al.*, 1995; Moura *et al.*, 1997; Joseph *et al.*, 2006; Graczyk *et al.*, 2007). Sin embargo, la microscopia de campo claro y los métodos de fluorescencia no son suficientes para determinar las especies de microsporidios, y la microscopía electrónica es poco práctico en la mayoría de las situaciones. Se han probado anticuerpos monoclonales contra esporas de *E. bienewisi*, estos anticuerpos no presentan reacción cruzada con otras especies *Encephalitozoon* (Accoceberry *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 2005). Estos podrían ser útiles para la detección de *E. bienewisi*, pero no puede diferenciar los aislamientos por debajo

del nivel de especie y actualmente no están disponibles para su distribución comercial. Métodos moleculares sensibles y específicos son utilizados para identificar genotipos de *E. bienewsi* y otros microsporidios. Pruebas de diagnóstico molecular para microsporidios han sido revisadas en detalle por Gosh y Weiss (2009). A pesar que las técnicas moleculares no están disponibles en laboratorios de diagnóstico clínico, son ampliamente utilizados en la investigación y algunos laboratorios de salud pública del gobierno. Debido a que la región espaciador transcrito interno ITS (por sus siglas en inglés de Internal Transcribed Spacer) del gen ARNr tiene un alto grado de diversidad entre los aislados, ha sido útil en muchos estudios para la detección e identificación de los genotipos de *E. bienewsi* (Santin y Fayer, 2009). Otros marcadores de genes se están buscando, pero la confianza en la secuencia sigue siendo el estándar actual para la identificación.

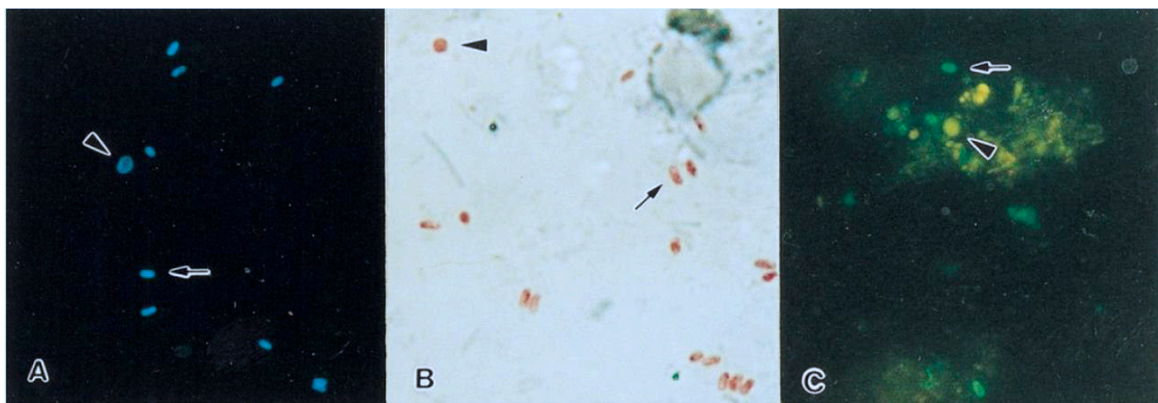


Figura 5. Diagnóstico de *Enterocytozoon bienewsi*. Esporas observadas por microscopía de fluorescencia usando la técnica de Calcofluor (A). Tinción de tricromica modificada (B). Inmunofluorescencia indirecta usando anticuerpos policlonal murino (C) (Didier, 2000).

1.6. Inmunología

1.6.1. Respuesta inmune mediada por células

La respuesta inmune mediada por células, parece ser la más importante para prevenir la enfermedad. Ratones atímicos, inmunodeficientes (SCID) y CD8 + T-cell knockout (KO), mueren a causa de la infección con microsporidios. Esto pudiera darse en humanos, por ejemplo, los pacientes con SIDA, pacientes tratados con terapia inmunosupresora y pacientes con trasplante de órgano) son particularmente susceptibles a la microsporidiosis (Schmidt y Shadduck, 1983; Koudela *et al.*, 1993; Didier, 1999; Khan *et al.*, 1999). Ratones atímicos y SCID pueden ser protegidos de las infecciones

por *E. cuniculi* letal, por la transferencia de células T sensibilizados de bazo. La transferencia de linfocitos B sensibilizados, macrófagos, o suero hiperinmune no prolongan la supervivencia de los ratones (Schmidt y Shadduck, 1983, 1984).

Las células T CD4 + y CD8 + son probablemente importantes en la resistencia de la infección por microsporidios. Las células T CD8 + ratones KO aumentan y mueren en la infección por *E. cuniculi*. Sin embargo, las células T CD4 + de ratones KO sobreviven a la infección con *E. cuniculi*. Las células T CD4 + presentan importancia en la resistencia frente a microsporidios, debido a que en pacientes con SIDA que presentan niveles por debajo de 50 células T por microlitro de sangre, se hacen más susceptibles a presentar microsporidiosis (Kotler y Orenstein, 1998; Dascomb *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 1999; Kotler y Orenstein, 1999).

La citoquina interferón-gamma (IFN- γ) parece ser particularmente importante en la resistencia frente a microsporidios. Estudios *in vitro* demuestran que los macrófagos peritoneales murinos podrían ser activados para eliminar a *E. cuniculi* después de la incubación con IFN- γ con o sin lipopolisacáridos (Didier, 1995). Se ha demostrado que ratones BALB/c infectados con *E. cuniculi*, aumentan los niveles séricos de IFN- γ entre los días 11 y 22 post-infección en comparación con los sueros de los ratones no infectados (Khan y Moretto, 1999). Así mismo, ratones tratados con anticuerpos anti-IFN- γ eran susceptibles a infecciones por *E. cuniculi* hasta causar la muerte de los ratones (Achbarou *et al.*, 1996; Khan y Moretto, 1999).

1.6.2. Respuesta inmune humoral

Las inmunoglobulinas IgM y IgG contra microsporidios, se generan en los hospederos inmunocompetentes infectados, y persisten durante toda la vida del hospedero (Didier *et al.*, 1998; Didier, 1999). Las respuestas de anticuerpos son variables en hospederos inmunocomprometidos, y se presume que estos complejos inmunes son los responsables de generar la enfermedad renal. Ratones atímicos recibieron una transferencia pasiva de suero hiperinmune, la cual no protegió a los ratones frente a la infección por *E. cuniculi* ocasionándole la muerte. Esta resistencia por parte de los microsporidio se deba a la resistencia basada en estudios *in vitro* con *E.*

cuniculi. También, se ha demostrado que los anticuerpos opsonizan microsporidios para facilitar que sean fagocitados por los macrófagos (Schmidt y Shadduck, 1984; Enriquez *et al.*, 1998).

1.7. Tratamiento

El albendazol y la fumagilina son los fármacos más comunes utilizados actualmente para tratar la microsporidiosis en animales y humanos. El bencimidazol, albendazol, es un inhibidor de tubulina (microtúbulos), es eficaz contra el *Encephalitozoon* que es un microsporidio que infecta a los mamíferos incluyendo a los humanos, pero presenta una eficacia variable contra el microsporidio *E. bienewsi* (Blanshard *et al.*, 1992; Dieterich *et al.*, 1994). El albendazol se administra generalmente en una dosis de 400 mg dos veces al día durante dos a cuatro semanas y se ha demostrado que elimina las infecciones por *Encephalitozoon* y *Enterocytozoon*. El benzimidazol, metronidazol, es efectivo contra los microsporidios, administrado en una dosis de 500 mg tres veces al día, pero puede producir un alivio temporal de síntomas debido a la infección por *E. bienewsi* (Gumbo *et al.*, 1999).

La fumagilina es un antibiótico producido por el hongo *Aspergillus fumigatus*, y es muy eficaz cuando se utiliza por vía tópica para el tratamiento de la queratoconjuntivitis por especies de *Encephalitozoon* (Friedberg y Ritterband, 1999). Cuando se administra sistémicamente a los seres humanos a una dosis de 20 mg tres veces al día, la fumagilina fue muy eficaz contra *E. bienewsi*, pero causó trombocitopenia de dos a tres semanas post administración (Molina *et al.*, 1997). Un análogo de la fumagilina llamado TNP-470 (también llamado AGM-1470) es menos tóxico en animales de laboratorio, y se encontró que era tan eficaz como la fumagilina contra varias especies de microsporidios *in vitro* (Didier, 1997; Coyle *et al.*, 1998; Didier *et al.*, 2006). Otro tipo de medicamentos con resultados variables que han sido reportados para el tratamiento de la microsporidiosis en los humanos incluyen la furazolidona, sinefungin, atovaquona, azitromicina, itraconazol, octreotida y sulfamidas (Weber *et al.*, 1994; Kotler y Orenstein, 1998; Kotler y Orenstein, 1999; Didier *et al.*, 2000).

2. *Giardia duodenalis*

2.1. Introducción

Giardia es un protozooario parásito que fue descrito por primera vez en el año 1859. Sin embargo, la relevancia clínica de su enfermedad “la giardiasis”, no se reconoció hasta finales del siglo 20 (Roberts-Thomson, 1993). En humanos, *Giardia* es reconocida como el parásito más común causante de diarrea. Estudios realizados por el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), mencionan una tasa de 280 millones de infecciones al año (Yoder *et al.*, 2010). La giardiasis es diagnosticada como una infección transmitida por agua y es de gran interés en las autoridades del agua potable. Debido al impacto en el desarrollo socioeconómico, especialmente en los países en desarrollo, *Giardia* es incluida desde el 2004 en la iniciativa de “Enfermedades Olvidadas” (*Neglected Disease*) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Lane y Lloyd, 2002; Savioli *et al.*, 2006).

En Medicina Veterinaria, *Giardia* tomo mucho interés en la década de 1990, impulsado principalmente por los problemas de salud pública, y en menor medida desde el punto de vista veterinario (Geurden *et al.*, 2010). Por lo tanto, la investigación de *Giardia* en el área de Veterinaria, se centró en estudios epidemiológicos y moleculares del parásito. La caracterización molecular de los aislamientos de diferentes hospedadores fue necesaria para dilucidar el peligro de zoonosis. Todo esto debido a que la producción de los animales han sido considerados como un potencial reservorio de infecciones zoonóticas de las infecciones por *Giardia* en humanos (Feng y Xiao, 2011). Actualmente, los estudios epidemiológicos moleculares y el análisis de genotipos han proporcionado una visión más amplia y detallada sobre el potencial zoonótico de los aislamientos de *Giardia* de animales de producción. Debido al énfasis de los patrones de transmisión, la relevancia clínica de la infección por *Giardia* en los animales se estudió sólo hasta cierto punto. En los animales de compañía, los veterinarios consideran a *Giardia* como una posible causante de diarrea. La prevalencia de *Giardia* en animales de producción es más elevada en comparación con los animales de compañía. Sin embargo, no es muy reconocido como una enfermedad importante

para los veterinarios, debido a la vaguedad de los signos asociados con la infección (Xiao, 1994; Feng y Xiao, 2011).

2.2. Taxonomía

En el 1980, la clasificación de los protozoos fue considerada como un subreino con siete Filos. La Sarcomastigophora (conteniendo a los Mastigophora y Sarcodina), Apicomplexa, Microspora, Myxozoa y Ciliophora, los cuales contenían un numero importantes de parásitos. Actualmente, la clasificación de los protozoos los establece dentro del reino de los eucariotas y se reconoce un total de 13 Filos. Los flagelados, los cuales pertenecían a los Mastigophora ahora están distribuidos en cuatro filos: los Metamonada, Parabasalia, Percolozoa y Euglenozoa. Estos nuevos avances en los que respecta la taxonomía de los protozoos han llegado a realizarse gracias a los estudios moleculares, genéticos, estructurales y bioquímicos (Cox, 2002; Cavalier-Smith y Chao, 2003; Plutzer *et al.*, 2010). Por lo tanto, la antigua clasificación de *Giardia*, basada únicamente por su morfología (Fig. 6) era: Filo Sarcomastigophora, Subfilo Mastigophora (=Flagellata), Clase Zoomastigophorea, Orden Diplomonadida y Familia Hexamitidae (Morrison *et al.*, 2007). De acuerdo con Cavalier-Smith (Cavalier-Smith y Chao, 2003) la taxonomía y sistemática actual de *Giardia* es considerada en:

Filo: Metamonada (Grassé, 1952) Cavalier-Smith, 1981

Subfilo: Trichozoa (Cavalier-Smith 1996) Cavalier-Smith, 2003

Superclase: Eopharyngia (Cavalier-Smith, 1993) Cavalier-Smith, 2003

Clase: Trepomonadea Cavalier-Smith, 1993

Subclase: Diplozoa (Dangeard, 1910) Cavalier-Smith, 1996

Orden: Giardiida (Cavalier-Smith, 1996)

Familia: Giardiidae (Cavalier-Smith, 1996)

Género: *Giardia* (Kunstler, 1882)

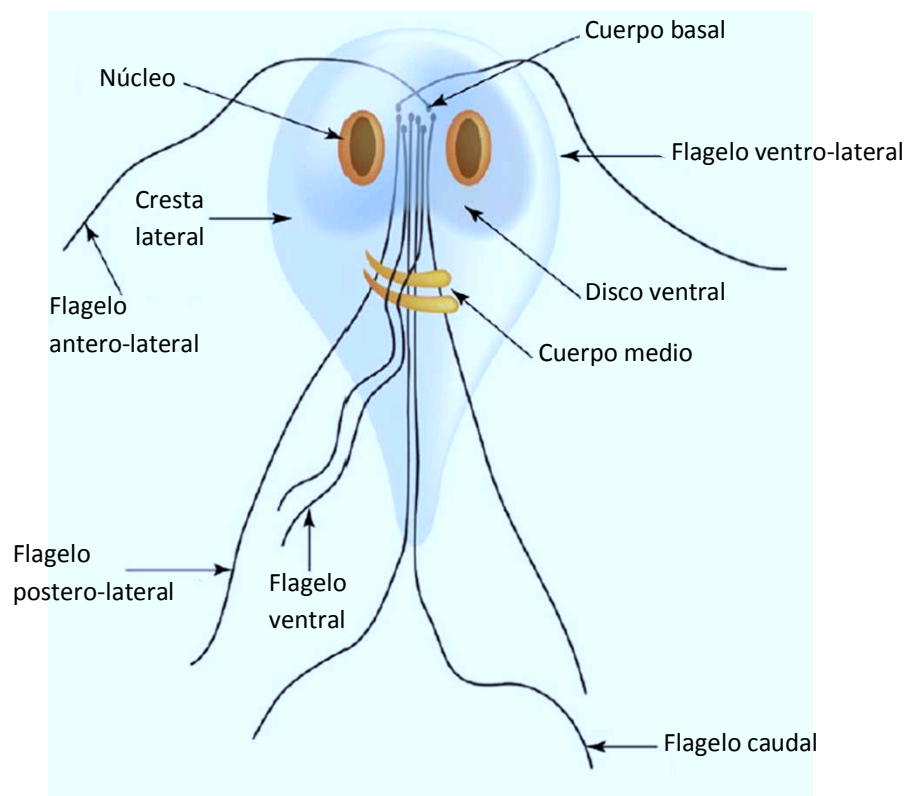


Figura 6. Morfología del trofozoito de *Giardia duodenalis* (Monis *et al.*, 2009)

2.2.1. Especies de *Giardia*

La taxonomía sobre las especies de *Giardia* fue revisado por muchos investigadores, siendo hasta ahora un problema de debate respecto a su nomenclatura (Thompson y Monis, 2004; Caccio *et al.*, 2005; Monis *et al.*, 2009). En la actualidad, seis especies de *Giardia* son aceptados por la mayoría de los investigadores: *G. agilis*, *G. ardeae*, *G. muris*, *G. microti*, y *G. psittaci*. Estas especies parasitan únicamente a animales, mientras que *G. duodenalis* infecta a los seres humanos y una variedad mamíferos (Cuadro 1). En 1997, Upton y Zien realizan una descripción de una especie única para los reptiles, fue conocida primariamente como *G. duodenalis* –like. Sin embargo, este parasito carecía en su mayoría de cuerpo mediano y tenía quistes binucleados, finalmente la especie fue considerada como *G. varani* (Upton y Zien, 1997). Por cuestiones filogenéticas, se esperaba que los peces tengan una especie propia de *Giardia*. Sin embargo, un estudio realizado en Australia demostró ensamblajes zoonoticos (ensamblaje A y B), así como ensamblajes de rumiantes (ensamblaje E) y *G. microti* en peces de aguas dulces y marinas. Hasta ahora no está claro si en el estudio de

Australia los peces estaban infectados con *Giardia*, o solo actuaban como vectores mecánicos (Yang *et al.*, 2010).

Cuadro 1. Especies reconocidas en el género *Giardia* 1952-2007 *

Especie	Hospedero	Características morfológicas	Dimensiones del trofozoito	
			Largo	Ancho
<i>G. duodenalis</i>	Mamíferos domésticos y silvestres, incluyendo humanos	Trofozoito en forma de pera, disco ventral a la mitad del cuerpo	12–15 µm	6–8 µm
<i>G. agilis</i>	Anfibios	Trofozoito alargado	20–30 µm	4–5 µm
<i>G. muris</i>	Roedores	Trofozoito redondeado	9–12 µm	5–7 µm
<i>G. ardeae</i>	Aves	Trofozoito redondeado, con prominente disco ventral	~10 µm	~6.5 µm
<i>G. psittaci</i>	Aves	Trofozoito en forma de pera, ausencia de flagelo ventro-lateral	~14 µm	~6 µm
<i>G. microti</i>	Roedores	Trofozoito similar a <i>G. duodenalis</i>	12–15 µm	6–8 µm

*Monis *et al.*, 2009

Los nombres de las especies *Giardia duodenalis*, *Giardia intestinalis* y *Giardia lamblia* son utilizados indistintamente en la literatura actual, refiriéndose al mismo organismo (Xiao y Fayer, 2008). Los nombres que son usados con mayor frecuencia son *G. duodenalis* y *G. intestinalis*, refiriéndose a la misma especie de *Giardia* que parasita a humanos, animales de compañía y al ganado. Estas opiniones difieren en cuanto a la legalidad del nombre *G. intestinalis*, en gran parte debido al no cumplir con las reglas del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (Monis *et al.*, 2009; Thompson *et al.*, 2000). Para efectos de consistencia, se decidió usar *G. duodenalis* en el presente manuscrito. En Medicina Humana, *G. lamblia* es comúnmente usado para tratar las especies de *Giardia* que infecta a los humanos (Monis *et al.*, 2009). Debido a los numerosos análisis biológicos y genéticos recientes, se han demostrado que las especies de *Giardia* presente en humanos puedan también ser encontrados en una amplia gama de otras especies de mamíferos (Xiao y Fayer, 2008; Feng y Xiao, 2011).

A pesar que *G. duodenalis* es la única especie encontrada en humanos y otros mamíferos, ahora se considera a *G. duodenalis* un complejo de varias especies (Cuadro 2). Históricamente, los análisis de aloenzimas, agrupó los aislamientos de humanos en dos ensamblajes genéticos (ensamblajes A y B), que abarcaba por lo menos cuatro grupos genéticos (grupos I a IV) (Monis y Thompson, 2003). Los análisis filogenéticos de secuencias de nucleótidos del gen de la subunidad menor (SSU) rRNA y otros genes que codifican la glutamato deshidrogenasa (GDH), β -Giardin (BG), factor de elongación 1 alfa (EF1), y triosephosfato isomerasa (TPI) han confirmado la singularidad genética de los ensamblajes A y B. Adicionalmente, linajes de *G. duodenalis* de los animales fueron identificados como: ensamblaje C y D para los perros, ensamblaje E para artiodáctilos, ensamblaje F de los gatos, ensamblaje G de los roedores y ensamblaje H para focas (Gaydos *et al.*, 2008; Thompson *et al.*, 2008; Xiao y Fayer, 2008; Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010).

En vista de la especificidad de los ensamblajes para los hospedadores y las características genéticas de los ensamblajes de *G. duodenalis*, recientemente se ha intentado reutilizar algunos de los nombres de las especies utilizadas anteriormente en base a la ocurrencia en los hospedadores (Monis *et al.*, 2009). Por lo tanto, se ha propuesto utilizar los nombres de *G. duodenalis* al ensamblaje A, *G. enterica* para el ensamblaje B, *G. canis* para los ensamblajes C y D, *G. bovis* para el ensamblaje E, *G. cati* al ensamblaje F, y *G. simondi* al ensamblaje G (Thompson y Monis, 2004; Thompson *et al.*, 2008; Monis *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010). Esta sugerencia aparentemente tiene un sentido lógico y podría reducir la confusión en la taxonomía de *Giardia*, y otorgar una mejor comprensión en la epidemiología de la giardiasis. Para poder usarse esta taxonomía propuesta, en cumplimiento con el Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, antes de usar las nuevas especies de *Giardia* tendría que realizarse una re-descripción de estas especies, que incorporen modernos datos biológicos y genéticos. Probablemente, la única dificultad para la denominación de la especie que infecta a perros serían los ensamblajes C y D. Esta especie de *Giardia* podría ser problemático, debido a la divergencia genética en los nucleótidos de la secuencia entre los dos ensamblajes en base al análisis de varios genes (TPI, GDH, BG) (Yang *et al.*, 2010).

Cuadro 2. Grupos genotípicos (ensamblajes) de *Giardia duodenalis* y especies basadas sobre su original descripción taxonómica (Monis *et al.*, 2009).

Especies (ensamblajes)	Hospederos
<i>G. duodenalis</i> (= ensamblaje A)	Humanos y otros primates, caninos, felinos, ganado, roedores y otros mamíferos silvestres
<i>G. enterica</i> (=ensamblaje B)	Humanos y otros primates, caninos y otros mamíferos silvestres
<i>G. agilis</i>	Anfibios
<i>G. muris</i>	Roedores
<i>G. psittaci</i>	Aves
<i>G. ardeae</i>	Aves
<i>G. microti</i>	Roedores
<i>G. canis</i> (=ensamblaje C/D)	Perros y otros canidos
<i>G. cati</i> (=ensamblaje F)	Gatos
<i>G. bovis</i> (=ensamblaje E)	Bovinos y otros ganados
<i>G. simondi</i> (=ensamblaje G)	Ratas

2.2.2. Genotipos (ensamblajes) de *Giardia duodenalis*

Entre los ensamblajes de *G. duodenalis*, los ensamblajes A y B tienen la más amplia diversidad de hospedadores, infectando a humanos y otros mamíferos (Caccio *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2008; Xiao y Fayer, 2008). El ensamblaje A se encuentra con frecuencia en el ganado (bovinos, búfalos, ovejas, cabras, alpacas y cerdos) y animales de compañía (perros, gatos y caballos). En comparación, el ensamblaje B es menos frecuente para el ganado y animales de compañía. Actualmente, existen pocos informes de infección por ensamblaje B en el ganado vacuno, ovejas, caballos, perros, gatos, y conejos. El ensamblaje A y en menor medida el ensamblaje B, se encuentran comúnmente en animales silvestres, con la excepción de los castores y ratones almizcleros, que al parecer tienen una alta incidencia por el ensamblaje B. Ambos ensamblajes A y B son frecuentes en humanos y numerosas especies de mamíferos (Cuadro 2), esto indica su potencial zoonóticos de los ensamblajes A y B (Yang *et al.*, 2010).

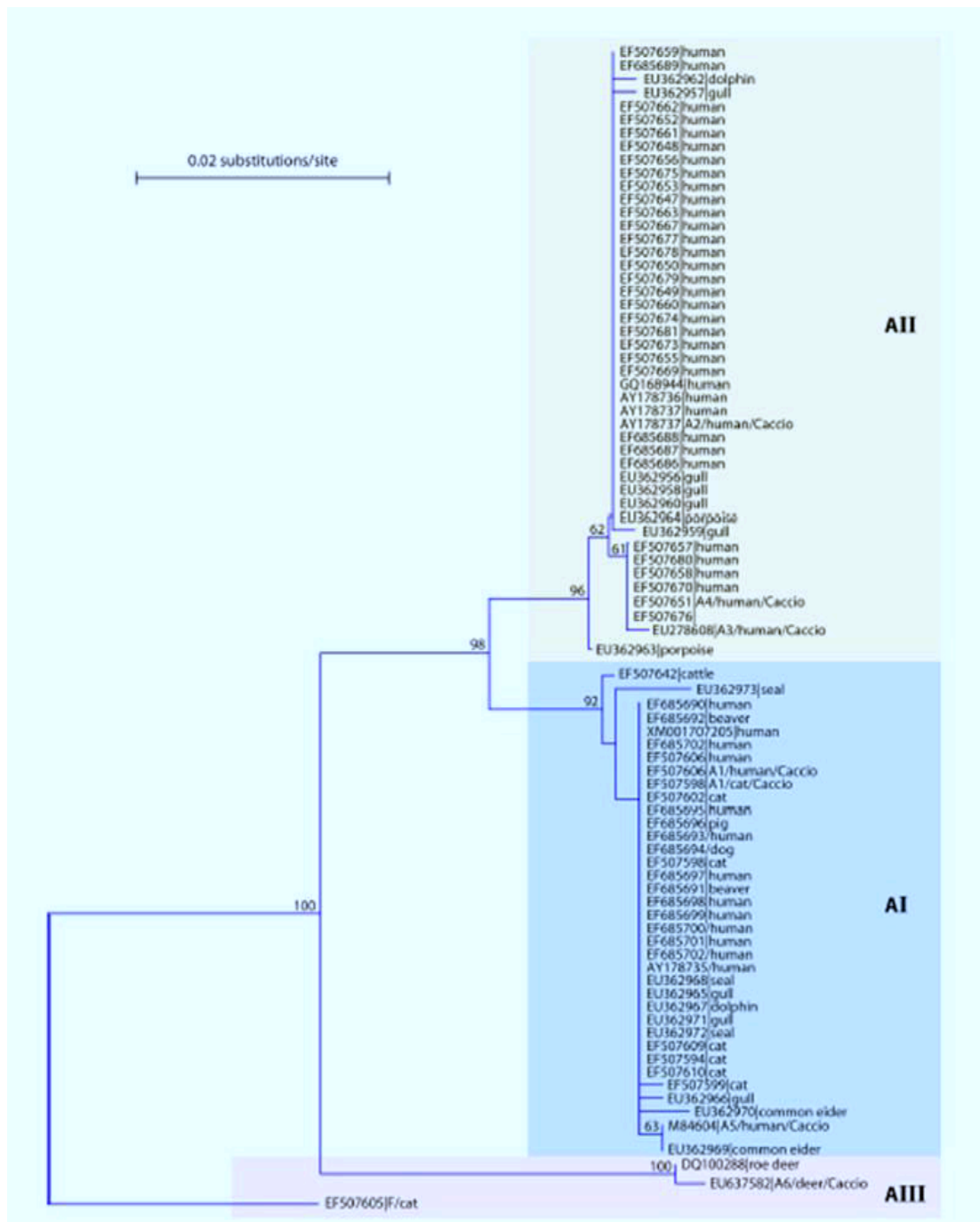


Figura 7. Análisis filogenético del locus GDH de los sub-ensamblajes AI, AII y AIII (Feng y Xiao, 2011).

Existe una sub-nomenclatura en lo que respecta el ensamblaje A, que consiste principalmente de dos grupos, subgrupos o sub-ensamblajes: AI, AII y AIII (Fig. 7). La separación de los subgrupos AI y AII se hizo inicialmente por el análisis de aloenzimas

y con el apoyo de los análisis filogenéticos de las secuencias del ensamblaje A en el locus GDH. Recientemente, un tercer subgrupo se agregó al ensamblaje A: subgrupo AIII, parece estar relacionado principalmente con los ungulados salvajes (van der Giessen *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2007; Caccio *et al.*, 2008). El sub grupo AIII, tiene diferencias significativas en su secuencia comparada con los subgrupos AI y AII en todos los loci examinados hasta el momento. Más recientemente, en base a un análisis de los loci TPI, GDH, y b-giardin, el subgrupo AIII se ha encontrado en gatos, ganado y animales silvestres, pero hasta el momento no se ha encontrado en perros, cabras, ovejas, cerdos y seres humanos (Sprong *et al.*, 2009).

Los ensamblajes C, D, E, F y G tienen especificidades alta de hospedadores. Los ensamblajes C y D se han encontrado principalmente en los perros, caninos silvestres como zorros y coyotes; así como en animales relacionados con caninos (focas) (Fig. 8) (Lasek-Nesselquist *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). El ensamblaje E se ha encontrado en gran parte en los mamíferos ungulados domésticos (ganado vacuno, búfalos, ovejas, cabras, alpacas y cerdos) (Olson *et al.*, 2004; O'Handley y Olson, 2006; Thompson *et al.*, 2008; Trout *et al.*, 2008). Los ensamblajes F y G se han encontrado sobre todo en gatos y roedores, respectivamente (Ballweber *et al.*, 2010; Tangtrongsup y Scorza, 2010). Sin embargo, hay excepciones ocasionales a la especificidad del hospedador. Por lo tanto, los ensamblajes C y D se registraron en gatos (Read *et al.*, 2004; Palmer *et al.*, 2008) y seres humanos (Traub *et al.*, 2009), el ensamblaje D se informó en dos cerdos (Langkjaer *et al.*, 2007; Sprong *et al.*, 2009), el ensamblaje E asamblea se ha reportado en gatos (Read *et al.*, 2004; Sprong *et al.*, 2009; Lebbad *et al.*, 2010) y seres humanos (Foronda *et al.*, 2008), y el ensamblaje F se ha registrado en un cerdo (Ash *et al.*, 2010) y en seres humanos (Fig. 8) (Gelanew *et al.*, 2007). Se cree comúnmente que los seres humanos sólo están infectadas con conjuntos A y B, y la reciente identificación de genotipos inusuales, como los ensamblajes C, D, E y F de *G. duodenalis* en los seres humanos exige una completa caracterización genética de los parásitos (Gelanew *et al.*, 2007; Foronda *et al.*, 2008; Trout *et al.*, 2008).

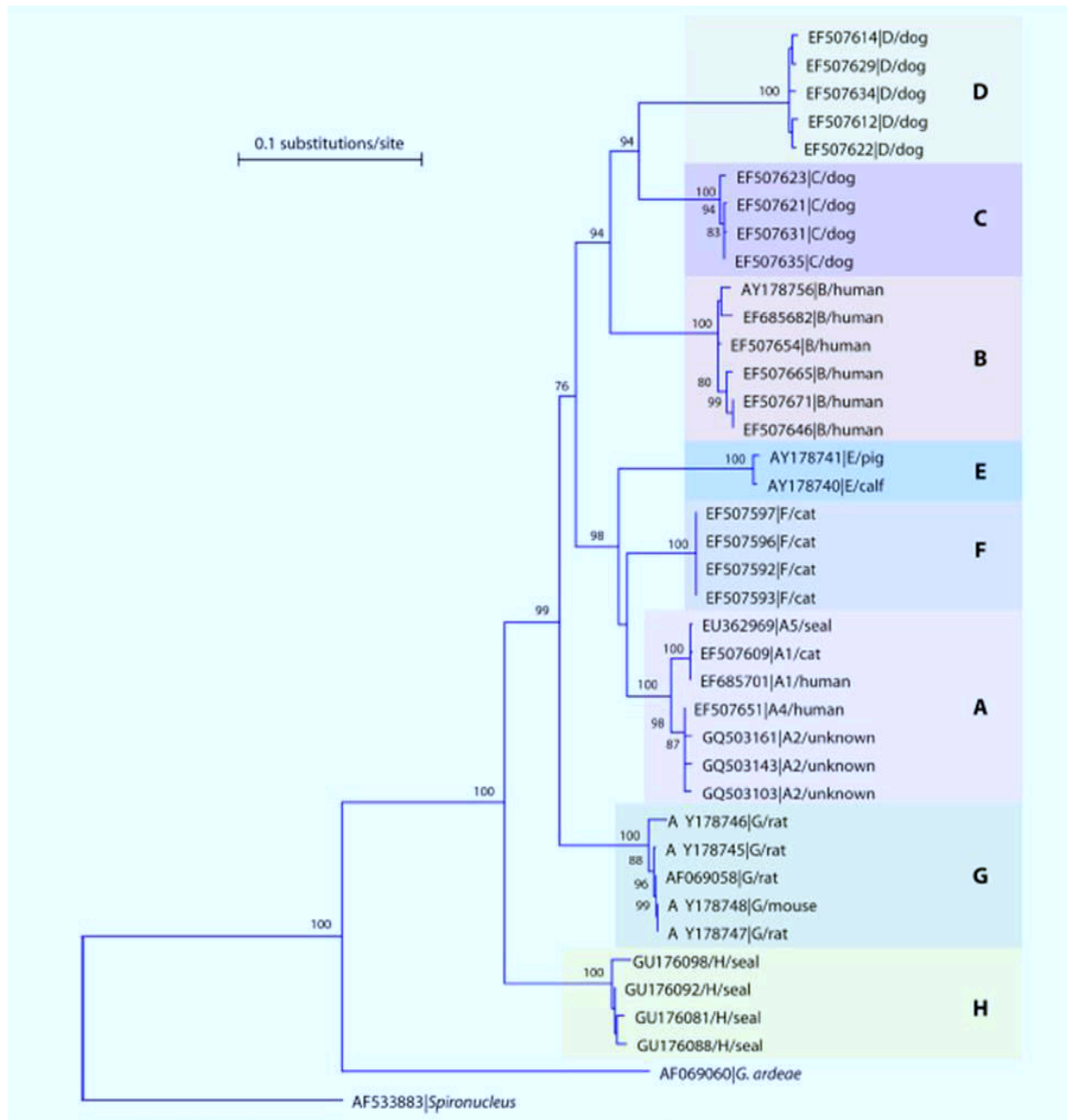


Figura 8. Análisis filogenético del locus GDH de los ensamblajes de *Giardia duodenalis* (Feng y Xiao, 2011).

2.3. Epidemiología molecular

Respecto a la prevalencia de *Giardia* en diferentes especies animales, incluyendo humanos, y nuestra comprensión actual de los principales grupos genéticos de *G. duodenalis*, existe cuatro grandes ciclos de transmisión que mantienen el parásito en el mamífero hospedero (Fig. 9). Sin embargo, se debe de tener en cuenta cómo estos ciclos pueden interactuar, y tratar de determinar la frecuencia de transmisión de los genotipos zoonóticos (Thompson, 2004).

2.4. Ciclos de transmisión

2.4.1. Humanos

La transmisión de *Giardia* de humano a humano puede ocurrir de manera indirecta a través de la ingestión accidental de quistes en agua o alimentos contaminados, o directamente en el medio ambiente donde los niveles de higiene puedan verse comprometida (Thompson *et al.*, 1993). En entornos en los que la frecuencia de transmisión es elevada y donde las condiciones son propicias para la transmisión, como zonas endémicas, es de esperar que las interacciones competitivas pudieran resultar en el predominio de genotipos particulares. Sin embargo, esto no parece ser el caso. Un estudio que examinó *Giardia* en seres humanos y perros en la misma comunidad encontró que todos los aislamientos humanos eran ensamblaje A o B y que todos los aislamientos de perro, con una sola excepción, eran de ensamblaje C o D (ensamblaje específicos de perros) (Hopkins *et al.*, 1997). La excepción fue un perro que tenía una infección mixta de ensamblaje B y C, lo que sugiere que tal vez el perro estaba infectado de una fuente humana. Del mismo modo, un estudio realizado sobre giardiasis en los gorilas en un área remota en Uganda encontró que estaban infectados con el ensamblaje A, y que los guardaparques humanos fueron la causa más probable de la infección como resultado de la defecación indiscriminada (Graczyk *et al.*, 2002).

Un reciente estudio del Reino Unido que se examinaron 35 muestras clínicas humanas encontró que el 64% fueron por el ensamblaje B, el 27% ensamblaje AII y el resto tenían infección mixta de ensamblaje AII y B (Amar *et al.*, 2002). De manera similar, una encuesta institucional en Australia encontró que las infecciones por el ensamblaje B fueron más frecuentes (70%) que el ensamblaje A (30%) (Read *et al.*, 2002). Por otro lado, el ensamblaje B fue responsable de un brote en una guardería en el Reino Unido, donde 21 de 24 (88%) casos humanos fueron infectados por este genotipo (Amar *et al.*, 2002). Así mismo, muestras humanas de las comunidades productoras de Té en Assam, India, la prevalencia de infección por el ensamblaje B era de 61% y 39%, respectivamente (Traub *et al.*, 2004). Estas encuestas proporcionan datos valiosos ya que hay evidencia que los ensamblajes A y B difieren en virulencia. Un estudio longitudinal en centros de día en Perth, Australia, encontraron que los niños infectados

con *Giardia* ensamblaje A tenían 26 veces más probabilidades de tener diarrea que los niños infectados con *Giardia* ensamblaje B (Read *et al.*, 2002).

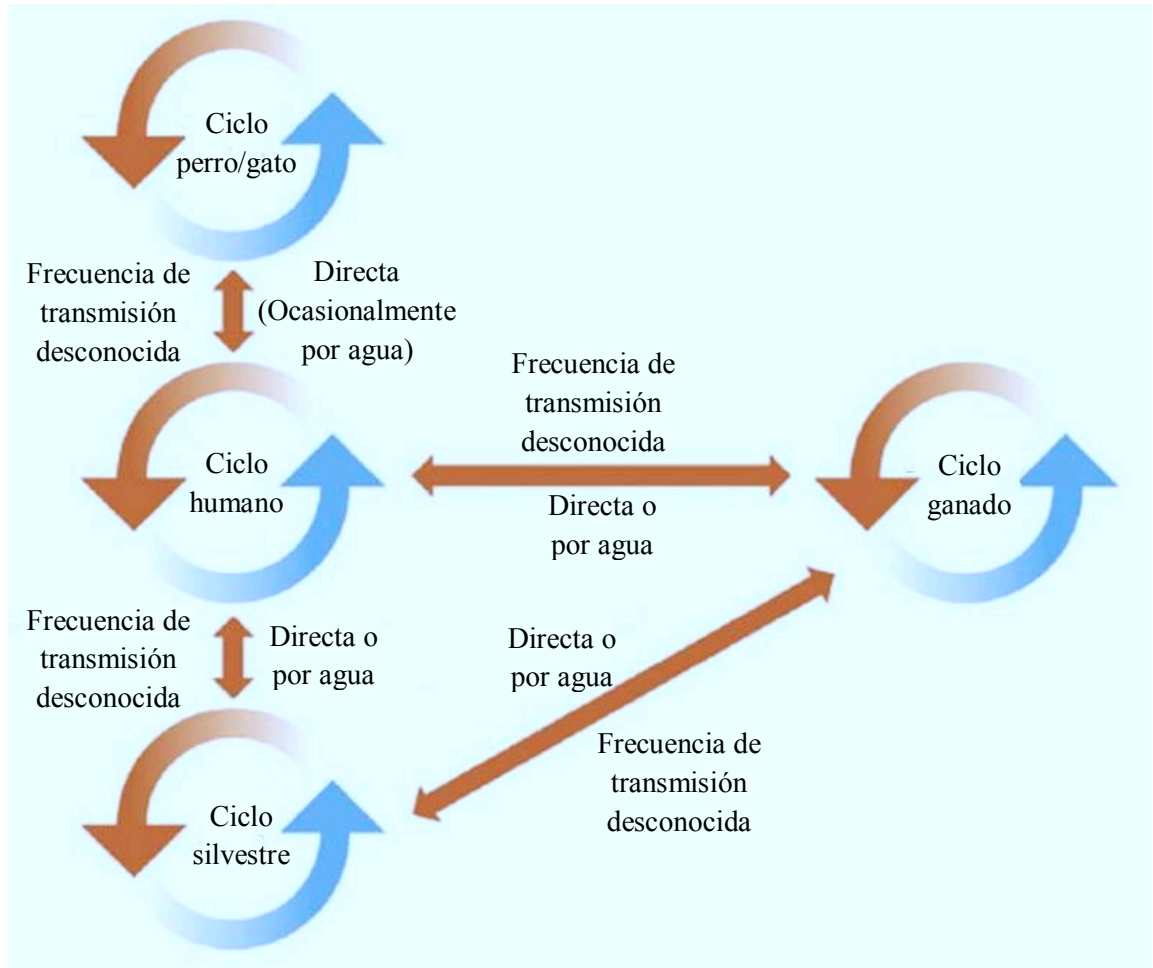


Figura 9. Ciclo de vida de *Giardia duodenalis* (Didier, 2000)

2.4.2. Ganado

La infección por *Giardia* en el ganado de edades jóvenes, principalmente terneros, ha tenido mucha importancia debido a los altos niveles de infección y su alta prevalencia (Thompson, 2000; Olson *et al.*, 2004). *Giardia* se ha encontrado tanto en ganado de carne y lechero en todo el mundo, y los estudios longitudinales han demostrado de forma consistente tasas de prevalencia de hasta un 100% (Xiao y Herd, 1994; O'Handley *et al.*, 2000b; Ralston *et al.*, 2003; O'Handley y Olson, 2006). El patrón de infección de *Giardia* es similar en ganado de carne y de leche, en ambos grupos se logra observar quistes en las heces aproximadamente a las 4 semanas de edad

(Ralston *et al.*, 2003; O'Handley y Olson, 2006). Los terneros tienen intensidades más altas de excreción de quistes, que van desde 105 a 106 quistes por gramo de heces entre las 4 y 12 semanas de edad (O'Handley *et al.*, 2000b; Ralston *et al.*, 2003; O'Handley y Olson, 2006). Un aumento en la excreción de quistes periparto también se ha demostrado (Ralston *et al.*, 2003). La transmisión se produce entre los becerros infectados, así como adultos con infección crónica, pero la frecuencia de transmisión es particularmente alta entre los terneros lecheros (Xiao, 1994; O'Handley *et al.*, 2000b; Ralston *et al.*, 2003; O'Handley y Olson, 2006).

Las infecciones por *Giardia* en el ganado bovino son clínicamente importantes y puede tener importancia económica por ocasionar bajas en la producción (Olson *et al.*, 2004; O'Handley y Olson, 2006). *Giardia* se ha implicado como un agente etiológico solo y en combinación con otros agentes patógenos entéricos en la diarrea del ternero (Xiao, 1994; Huetink *et al.*, 2001; Olson *et al.*, 2004; O'Handley y Olson, 2006). Estos estudios demostraron que las infecciones concurrentes con *Giardia* y *Cryptosporidium* en los terneros eran comunes, y eran la causa principal de diarrea en terneros menores de 30 días de edad, mientras que *Giardia* sola se asoció con diarrea en terneros de mayor edad. El impacto de la giardiasis crónica en el rendimiento de los terneros se puede reflejar en una deficiencia alimentaria y disminución de peso de la canal, esto se ha demostrado en corderos infectados experimentalmente (Olson *et al.*, 1995).

Estudios recientes han demostrado que las crías de ganado lechero y de carne pueden albergar uno o dos genotipos de *G. duodenalis*. Aunque el genotipo de ganado (ensamblaje E) de *Giardia* parece ocurrir con más frecuencia en el ganado vacuno, los estudios en Canadá y Australia han demostrado que una pequeña proporción de vacas en el hato (<20%), presentaban el genotipo más común reportados en humanos (ensamblaje A) (O'Handley *et al.*, 2000b; Thompson, 2004). Sin embargo, un reciente estudio longitudinal más amplio en hatos lecheros en Australia, mostró que durante varios meses el 100% de los terneros se infectan durante las primeras 12 semanas de vida, y el genotipo hallado era el ensamblaje E propia del ganado (Thompson, 2004).

2.4.3. Perros y gatos

Estudios recientes realizados en Australia demostraron que *G. duodenalis* fue el parásito entérico más común de perros y gatos domésticos (Bugg *et al.*, 1999; McGlade *et al.*, 2003). Así mismo se ha demostrado que es un parásito muy frecuente en perros y gatos en los EE.UU. y en animales domésticos en otros países (Palmer *et al.*, 2008a; Ferreira *et al.*, 2011). Sin embargo, se ha sugerido que las tasas de prevalencia de *Giardia* en los animales de compañía son a menudo subestimados debido a la baja sensibilidad de los métodos de detección convencionales (microscopía óptica) (McGlade *et al.*, 2003). A pesar que *Giardia* son comunes en perros y gatos rara vez se asocia con enfermedad clínica en estos animales. Sin embargo, la giardiasis clínica se ha reportado y asociado en criaderos de animales y perreras, lugares donde el hacinamiento de animales puede causar estrés y exacerbar los efectos de una infección (Robertson *et al.*, 2000). El tratamiento de los perros y los gatos infectados por *Giardia*, generalmente es recomendado si son clínicamente enfermos, debido a la posibilidad percibida de transmisión zoonótica. El reciente desarrollo de vacunas para el tratamiento y la prevención de las infecciones por *Giardia* en perros y gatos y su aparente capacidad para reducir la duración de la eliminación de los quistes puede ser una alternativa a los fármacos para reducir las tasas de transporte de mascotas y la posterior contaminación del medio ambiente (Olson *et al.*, 2000). Estudios de epidemiología molecular han demostrado que los perros pueden ser infectados con su propio genotipo (ensamblaje C y D para perros; ensamblaje F para gatos), así como con los genotipos zoonóticos (ensamblaje A y B) (Yang *et al.*, 2010).

2.4.4. Animales silvestres

A pesar que en animales silvestres son vulnerables a la infección por genotipos zoonóticos de *G. duodenalis*, la limitada evidencia de los estudios en condiciones naturales sugiere que albergan su propios genotipos o especies de *Giardia* (Thompson, 2004). Por ejemplo, la caracterización genotípica de *Giardia* en marsupiales de Australia ha demostrado que están infectados con un nuevo genotipo genéticamente distinto de los conocidos (Adams *et al.*, 2004; Thompson *et al.*, 2010). Este hallazgo de altas tasas de prevalencia de *G. duodenalis* en una amplia variedad de animales de Tasmania podría no constituir necesariamente un riesgo para la salud pública, como ha

propuesto recientemente (Kettlewell *et al.*, 1998). La caracterización genotípica de aislamientos realizados ha demostrado distintos genotipos en roedores microtininos y en la mayoría de las aves estudiadas (McRoberts *et al.*, 1996; Monis y Thompson, 2003; Plutzer y Tomor, 2009; Siembieda *et al.*, 2011). Sin embargo, un estudio reciente en Australia comparó la situación sanitaria de las poblaciones de ratones en subantártica Macquarie y la isla Boullanger que tiene un clima mediterráneo árido, llegando a encontrar que los ratones albergaban diferentes genotipos de *Giardia* (Moro *et al.*, 2003). Se ha hallado genotipos zoonóticos en los ratones en ambas islas, pero en la isla Macquarie, los ratones fueron infectados también con nuevos genotipos de *G. duodenalis*. La fuente de infección en estos ratones todavía no se ha determinado (Thompson, 2004).

Otros animales como los castores, nutrias y venados son también hospedadores para *Giardia* en América del Norte con tasas de prevalencia de más del 50%. Sin embargo, no existe información sobre el genotipo de *Giardia* que llevan (Rickard *et al.*, 1999; Dunlap y Thies, 2002; Heitman *et al.*, 2002; Owen, 2005). Estudios recientes, confirmaron que el castor y el ciervo de cola blanca en vida libre pueden albergar genotipos zoonóticos de *G. duodenalis* (Dunlap y Thies, 2002; Trout *et al.*, 2003; Fayer *et al.*, 2006; Lalle *et al.*, 2007).

2.4.5. Zoonosis y transmisión por agua

Los datos moleculares han demostrado que el ganado, animales domésticos y animales silvestre pueden ser portadores de genotipos zoonóticos de *G. duodenalis*, así como los genotipos que parecen ser de hospedadores específicos (Thompson, 2004; Caccio *et al.*, 2005). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado a *Giardia* como un organismo con potencial zoonótico por más de veinte años (OMS, 1979), los estudios moleculares pueden rechazar este potencial zoonótico por la especificidad de hospedadores y los genotipos de *Giardia* (Thompson, 2004).

El consumo de agua potable que no sea de la red metropolitana, y otros suministros de filtrado representa un riesgo significativo para la giardiasis (Karanis *et al.*, 2007; Plutzer *et al.*, 2010). La mayoría de los brotes de giardiasis transmitidas por el

agua en humanos, se han producido en sistemas de aguas subterráneas, aguas superficiales o vertidos de aguas residuales (Dykes *et al.*, 1980; Bouzid *et al.*, 2008). Las aguas de riego utilizadas para cultivos de alimentos que tradicionalmente se consumen crudos también pueden representar un alto riesgo como una fuente de *Giardia* (Thurstion-Enriquez *et al.*, 2002). La contaminación ambiental de los sistemas de agua y provisiones pueden resultar de fuentes humanas, la agricultura y la vida silvestre (Heitman *et al.*, 2002). Se han realizados diversos estudios para determinar el significado de cada fuente con respecto a la presencia de *Giardia* en el ambiente. Las aguas residuales presentaron mayor prevalencia de *Giardia*, aunque la concentración de los quistes fue mínima en comparación con la detectada en las heces de ganado. Los animales que presentan mayor concentración de *Giardia* fueron el ganado bovino. Aunque la prevalencia global de la *Giardia* fue menor en los animales salvajes, la prevalencia en los mamíferos acuáticos como el castor y la rata almizclera era bastante alta. Una interpretación de estos resultados en el contexto de la fuente (s) de infecciones humanas con *Giardia* debe hacerse en conjunción con los datos de los genotipos de *Giardia* en estos animales (Thompson, 2004).

Como se mencionó anteriormente, el mayor riesgo zoonótico de los genotipos de *Giardia* es el ensamblaje A, en particular los del subgrupo AI, y en menor medida los genotipos o ensamblaje B. Por el contrario, los genotipos de los animales parecen ser de hospedadores específicos, restringido para el ganado, perros y roedores (Yang *et al.*, 2010). No existe ninguna evidencia epidemiológica que sugiera que se producen con frecuencia en la población humana y por tanto su riesgo zoonótico parece ser mínima. Sin duda, esto parece ser el caso de los bovinos. A pesar de que es claramente un potencial definido para la contaminación microbiana de las aguas superficiales y subterráneas de las explotaciones ganaderas (Donham, 2000), los estudios sugieren que el riesgo para la salud pública de ganado puede ser mínima, por lo menos en América del Norte y Australia, donde ha llevado a cabo la genotipificación y ha demostrado que el genotipo de ganado parece predominar en el ganado bovino (O'Handley *et al.*, 2000b; Hoar *et al.*, 2001). El ganado es susceptible a la infección por los genotipos zoonóticos de *Giardia* y se ha demostrado que los terneros infectados con *Giardia* arrojar de 10⁵ a 10⁶ quistes por gramo de heces (Xiao y Herd, 1994; O'Handley *et al.*,

2000b). Por lo tanto, los pocos terneros que son infectados con el genotipo del ensamblaje A podrían representar un riesgo significativo para la salud pública. Esto es de importancia potencial para la salud pública y puede poner a los productores, y otros miembros de la comunidad, en situación de riesgo. Sin embargo, los estudios longitudinales en Australia indican que los genotipos zoonóticos sólo pueden estar presentes de forma transitoria en el ganado bovino (Graczyk *et al.*, 2002).

La presencia de *Giardia* en la fauna silvestre, particularmente las cepas que son morfológicamente idénticas a *G. duodenalis*, ha sido el factor más importante para incriminar a *Giardia* como un agente zoonótico. Por tanto, es sorprendente que haya tan poca evidencia para apoyar el papel de la fauna silvestre como reservorios de la enfermedad para los humanos, ya que ha dominado el debate sobre la transmisión zoonótica de *Giardia*, y en particular debido a que el agua es el vehículo principal para la transmisión. La asociación entre los animales infectados como los castores y los brotes de origen hídrico en la gente, fue lo que llevó a la OMS (1979) para clasificar a *Giardia* como un parásito zoonótico (Thompson *et al.*, 1993; Thompson, 2004; Yang *et al.*, 2010).

En animales silvestres, particularmente los mamíferos acuáticos, existe poca evidencia que la infección con *Giardia* sea algo común, teniendo como fuente principal de contaminación a los brotes de origen hídrico. Al parecer, estos animales son más propensos a tener la infección por el agua contaminada que con materia fecal de los humanos, o menos probable, el origen de los animales domésticos (Dykes *et al.*, 1980; Dunlap y Thies, 2002; Fayer *et al.*, 2006; Gaydos *et al.*, 2008; Feng y Xiao, 2011).

Algunos estudios han caracterizado genéticamente aislados de brotes asociados con agua, pero los sistemas de tipificado utilizados no permiten establecer la correlación con los ensamblajes o genotipos actualmente reconocidos (Isaac-Renton *et al.*, 1993). Un único estudio molecular realizado en castores, confirmó las hipótesis previas de que la fuente de infección por *Giardia* en los castores probablemente sea de origen humano (Dunlap y Thies, 2002; Fayer *et al.*, 2006). En este estudio, 12 de 113 (10,6%) muestras de heces de castor, provenientes de 6 de 14 diferentes de riberas en el sur de Alberta,

Canadá, fueron positivos para *Giardia*, todos aquellos fueron tipificados genéticamente con el gen 16S-rRNA, llegando a concluir que el genotipo era zoonótico y correspondía al ensamblaje A (Thompson, 2004; Yang *et al.*, 2010).

En la actualidad, no se sabe si la transmisión zoonótica de la giardiasis incide considerablemente en la etiología de los brotes de agua. Hasta la fecha, las *Giardia* de origen humano parece ser la principal fuente de contaminación del agua y como tal, puede tener un impacto negativo sobre la salud de los ecosistemas que conducen a infecciones en la fauna acuática. Estudios recientes han demostrado que los moluscos se alimentan por filtración, y son útiles como indicadores de la presencia de patógenos en el agua. Recientemente, gracias a la caracterización genotípica, los estudios demuestran la presencia de quistes de *Giardia* en almejas de un estuario de América del Norte (Graczyk *et al.*, 2002). Todos los aislados de las almejas fueron identificados como el genotipo o ensamblaje A, demostrando que las agua estaban contaminadas con heces de origen mamífero, más probable humanos, contiendo quistes de *G. duodenalis* de importancia para la salud pública (Miller *et al.*, 2005; Lucy *et al.*, 2008).

La posibilidad de que otros animales actúan como fuentes de contaminación de agua con *Giardia* de importancia zoonótica parece ser mínimo. Los perros y los gatos son susceptibles a la infección por los genotipos zoonótico de *Giardia*, pero las probabilidades de un evento de contaminación de agua por parte de un perro o un gato parece poco probable. Sin embargo, en el caso de la crisis del agua en Sydney, Australia 1998, los perros muertos que se encontraron cerca de un suministro de agua, fueron incriminados como una posible fuente de contaminación por *Giardia*, pero no hubo evidencia de infección en los perros, ni aislamientos y genotipos del agente (Thompson, 2004).

Aunque el significado clínico de *Giardia* en perros y gatos parece ser mínima, se ha especulado mucho acerca de la importancia para la salud pública de estas infecciones en los animales domésticos. En entornos domésticos, un estudio realizado en zonas urbanas de Australia, demostró que los perros portaban el genotipo zoonótico “ensamblajes A” y el genotipo del perro “ensamblaje D (Thompson *et al.*, 1999). Por tal

motivo, se considera probable que haya dos ciclos de transmisión, uno que tiene lugar en entornos urbanos con la posibilidad de transmisión zoonótica (ensamblaje A) entre las mascotas y sus dueños (Bugg *et al.*, 1999). En una encuesta reciente realizada en Japón encontró que los perros domésticos presentaban el genotipo propio del perro, Ensamblaje D (Abe *et al.*, 2003).

Estudios de epidemiología molecular en zonas endémicas a giardiasis, donde la frecuencia de transmisión de los genotipos zoonóticos y no zoonóticos es alta, han demostrado que el genotipo del perro predomina en los perros infectados (Hopkins *et al.*, 1997). En cambio, en comunidades remotas de Assam, al noreste de crecimiento la India, donde *Giardia* se encuentra en los seres humanos y sus perros, el 20% de los perros estaban parasitados con *Giardia*, y todos los genotipos eran zoonóticos, ensamblaje A. Esta diferencia puede reflejar una asociación más estrecha entre los perros y sus propietarios individuales en las comunidades, con la probabilidad de que los perros sean capaces de comer heces humanas en estas comunidades (Traub *et al.*, 2004; Traub *et al.*, 2009). En las comunidades aborígenes en Australia, este comportamiento de los perros es menos común y los perros tienden a permanecer juntos en manada. En entornos donde la presión de infección es menor, como los hogares domésticos en las zonas urbanas, los perros son tan susceptibles de albergar los genotipos zoonóticos de *Giardia* (ensamblaje A), así como el genotipo propio del perro (ensamblaje D) (Thompson *et al.*, 2008).

En condiciones donde las infecciones por *Giardia* son comunes en humanos y en perros, los perros tendrían la misma posibilidad de estar expuesto a los dos genotipos de *G. duodenalis*, el zoonótico y el propio de perros (Hopkins *et al.*, 1997; Thompson, 2004). Bajo estas circunstancias, experimentalmente se ha demostrado que el perro se adapta al genotipo, por la exclusión competitiva (Thompson *et al.*, 1996). En entornos domésticos, urbanos y en las comunidades de cultivo, la frecuencia de transmisión de perro a perro es menos frecuente y por lo tanto, las infecciones adquiridas por el genotipo Ensamblaje A en los perros es más probable que persista (Ballweber *et al.*, 2010).

Traub *et al.* (2004), proporcionó la primera evidencia directa de transmisión zoonótica entre perros y humanos, al encontrar el mismo genotipo de *Giardia* en las personas y los perros, no sólo en el mismo pueblo, sino también en la misma casa. Los aislados de *Giardia* se caracterizaron con tres diferentes genes, la SSU rDNA, factor de elongación 1-alfa (EF1-a) y la triosa fosfato isomerasa (TPI) (Traub *et al.*, 2004). La evidencia de transmisión zoonótica fue apoyado por datos epidemiológicos que muestran una asociación altamente significativa entre la prevalencia de *Giardia* en seres humanos y la presencia de un perro positivo a *Giardia* en la misma casa. Una de las principales conclusiones de este estudio fue la importancia de utilizar múltiples genes (*loci*) para definir los genotipos de *Giardia* en investigaciones epidemiológicas (Traub *et al.*, 2004; Ballweber *et al.*, 2010; Feng y Xiao, 2011).

2.5. Patogénesis y signos clínicos

Estudios previos demuestran asociación entre los signos clínicos con la infección por *Giardia* en animales de producción, pero aún no está clara la patogenia (Geurden *et al.*, 2010). Sin embargo, cada vez *Giardia* es sugerido por los investigadores como un patógeno primario en los animales de producción (O'Handley *et al.*, 1999; Aloisio *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2006a). Los estudios realizados en líneas celulares epiteliales en animales de laboratorio, así como en terneros y en cabritos indican que la giardiasis conduce a alteraciones de las microvellosidades, incluyendo una atrofia de las criptas y las vellosidades relacionándolos con una deficiencia en la producción de enzimas (Taminelli *et al.*, 1989; Buret *et al.*, 1990b; Ruest *et al.*, 1997; Koudela y Vitovec, 1998; Buret *et al.*, 2002; Scott *et al.*, 2002). En humanos, terneros y cabritos infectados con *Giardia*, la malabsorción se ha asociado con un mayor número de linfocitos intraepiteliales y una disminución de las vellosidades en relación a la cripta. Esta disminución de las vellosidades conduce a una disminución de la superficie, resultando en una absorción en el intestino delgado y una ingesta deficiente de agua, electrolitos y nutrientes (Farthing, 1997; Buret, 2007).

El efecto combinado de la disminución de la absorción y la deficiencia en la producción de enzimas da como consecuencia la presentación de diarrea y mala absorción, resultando en una disminución del peso corporal en rumiantes y en modelos

experimentales (Buret *et al.*, 1990a; Ruest *et al.*, 1997; Koudela y Vitovec, 1998). La reducción de la actividad de la lipasa y el aumento de la producción de mucina por las células caliciformes podría explicar la esteatorrea y diarrea mucosa que se han descrito en hospedadores infectados por *Giardia* (Zajac, 1992; Moncada *et al.*, 2003).

Dado que la patogenia de la giardiasis es una combinación de factores del hospedador y del parásito, los signos clínicos pueden variar considerablemente entre los animales y las especies animales. Esta falta de consistencia en los resultados clínicos indicaría que *Giardia* no es una causa importante de enfermedad clínica, sobre todo en los rumiantes. Sin embargo, varios estudios informan signos clínicos causados por *Giardia* en infecciones naturales y experimentales (Xiao *et al.*, 1993; Olson *et al.*, 1995; Koudela y Vitovec, 1998; O'Handley *et al.*, 1999; Aloisio *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2006a; Geurden *et al.*, 2006c). En cuanto a los parásitos protozoarios, como *Eimeria* y *Cryptosporidium*, el resultado clínico es determinada por varios factores, incluida la virulencia del parásito, la respuesta inmune del hospedador y la presión de la infección. Esta presión de la infección depende en gran medida del sistema de manejo con un mayor impacto en la salud y producción animal, así como en los sistemas de manejo de cría intensiva con estabulación en comparación con los sistemas extensivos (Geurden *et al.*, 2006b).

La infección puede resultar en diarrea que no responde al tratamiento con antibióticos o coccidiostáticos. La excreción de heces pastosas o líquidas de aspecto mucoide, podrían ser indicativo de la giardiasis, especialmente cuando la diarrea se produce en los animales jóvenes. En terneros infectados, puede ocurrir una diarrea aguda, aunque los síntomas crónicos e intermitentes son observados con mayor frecuencia (Geurden *et al.*, 2006a; Geurden *et al.*, 2006c). En cabritos y corderos, un modelo de infección experimental indicó la excreción de las heces sin forma diarreica, considerándose como heces aparentemente normales (Olson *et al.*, 1995; Koudela y Vitovec, 1998). Estos síntomas también fueron observados más adelante en una infección natural en los corderos con *G. duodenalis* ensamblaje B (Aloisio *et al.*, 2006). En los cerdos, una asociación significativa entre la infección por *Giardia* y la aparición de signos clínicos todavía no ha sido demostrado (Hamnes *et al.*, 2007). Junto a la

diarrea, existe un impacto potencial debido a la giardiasis en animales de producción. En cabritos y corderos infectados experimental, mostraron una disminución de la eficiencia alimenticia y, posteriormente, una disminución de la ganancia de peso (Olson *et al.*, 1995; Koudela y Vitovec, 1998).

En pacientes humanos, las infecciones con *Giardia* tiene más probabilidades de dar lugar a signos clínicos cuando la infección es dada por el ensamblaje B (Lee y Faubert, 2006). Así mismo, los estudios indican que las infecciones ocasionadas por el ensamblaje B dan lugar a una presentación de diarrea más persistente (Homan y Mank, 2001).

2.6. Diagnóstico

Debido a la variedad de los síntomas, el diagnóstico clínico de la giardiasis en animales de producción no es fácil, y se basa principalmente en la historia clínica, datos de la explotación y la exclusión de otras enfermedades infecciosas, como la coccidiosis. El diagnóstico clínico debe ser confirmado por la detección del parásito en una muestra de heces, ya sea por el examen microscópico, detección de antígenos o por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tangtrongsup y Scorza, 2010; Feng y Xiao, 2011). Dada la intermitente excreción de quistes, especialmente en la fase crónica de la infección, es necesario realizar muestreo múltiples del mismo animal durante tres días consecutivos o de varios animales en el centro de la vivienda misma (O'Handley *et al.*, 1999). Si *Giardia* está presente en la granja, los animales jóvenes deben ser incluidos en el muestreo ya que la excreción máxima se observa en los animales alrededor de 2-4 semanas de edad, aunque todavía no presenten ninguna sintomatología. El diagnóstico de una infección por *Giardia* por la detección de anticuerpos no es fácil de realizar, debido a que los títulos de anticuerpos no se incrementan significativamente después de la infección, tanto en los terneros como en corderos (Yanke *et al.*, 1998; O'Handley *et al.*, 2003).

2.6.1. Examen microscópico

Tanto los trofozoítos y los quistes de *Giardia* puede ser detectados por microscopía óptica, ya sea directamente o después de la concentración con sulfato de

zinc, sacarosa, o formalina. Sin embargo, la esteatorrea observada en la giardiasis puede interferir con la flotación de sacarosa (Xiao *et al.*, 1993; Xiao y Herd, 1994). Los trofozoítos a veces se puede detectar en muestras de heces con diarrea debido a la aumento del peristaltismo (Tangtrongsup y Scorza, 2010).

La detección de quistes en las heces es el preferido para el diagnóstico. También se puede hacer un examen de diagnóstico tiñendo los quistes, principalmente con lugol parasitológico y colorante tricrómico (Zajac, 1992, Addiss *et al.*, 1991). La principal ventaja del examen microscópico es el costo reducido de los reactivos. La mayor desventaja es la necesidad de un técnico experto y experimentado, la baja sensibilidad de la prueba en comparación con los ensayos inmunológicos y el tiempo perdido en el transporte y análisis en el laboratorio (Geurden *et al.*, 2004).

2.6.2. Detección de antígeno

Para la detección de antígeno del parásito existen una variedad de kits disponibles en el mercado como: ensayos de inmunofluorescencia (IFA), inmunoanálisis ligado a enzima (ELISA) y ensayos de fase sólida por inmunocromatografía (Xiao y Herd, 1993; Boone *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2003; Johnston *et al.*, 2003). La mayoría de las pruebas se han desarrollado y evaluado para su uso en muestras de heces humanas. IFA y ELISA copro-antígeno usan anticuerpos monoclonales contra proteínas de la pared del quiste. IFA se puede utilizar como una prueba cuantitativa, con un límite de detección estimado de alrededor de 1000 quistes por gramo de heces (qge) (Xiao y Herd, 1993). En terneros, tanto IFA y ELISA resultaron ser sensibles en ensayos específicos para el diagnóstico de la infección, en comparación con el examen microscópico (Geurden *et al.*, 2004).

Debido a la necesidad de equipos de laboratorio y personal capacitado, la principal desventaja de IFA y ELISA es el elevado costo y el tiempo perdido en transporte y análisis en el laboratorio. Esto puede ser evitado por el uso de inmunocromatografía que permite el diagnóstico en 15 min. La inmunocromatografía utiliza anticuerpos monoclonales específico contra trofozoíto o proteínas de la pared del quiste. En medicina veterinaria de la prueba SNAP_Giardia (IDEXX Laboratories, Inc.,

Westbrook, Maine, EE.UU.) es comercializado para su uso en perros y recientemente se ha demostrado ser una valiosa alternativa en el diagnóstico clínico de la giardiasis (Geurden *et al.*, 2008). En animales de producción, un ensayo inmunocromatográfico está disponible para los terneros (Speed_*Giardia*, BioVeto-Test, La Seyne-sur-Mer, Francia), pero aún no ha sido evaluado (Geurden *et al.*, 2010).

2.6.3. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

El PCR se utiliza principalmente para la identificación de diferentes especies y genotipos de *Giardia*, principalmente en investigación taxonómica y epidemiológica, aunque existe la posibilidad de uso diagnóstico. Varios genes son utilizados para la determinación del genotipo, y para el diagnóstico clínico, por ejemplo el 18S ADNr, el gen Triosa fosfato isomerasa (*tpi*), la enzima Glutamato deshidrogenada (*gdh*) y el gen beta-giardin (β -giardin) (Monis *et al.*, 1996; Caccio *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2003). Los genes *tpi* y β -giardin parecen ser los más adecuados (Caccio y Sprong, 2010). En teoría, el límite de detección del PCR es un quiste, que mejora considerablemente la sensibilidad diagnóstica (Amar *et al.*, 2002). Sin embargo, varios factores pueden interferir con tales como la inhibición, que se sabe que se producen con frecuencia en el ADN extraído de las muestras fecales de PCR. Además, la extracción de ADN del parásito en las heces debe ser estandarizada para uso en el diagnóstico. En la actualidad, el PCR es considerado como demasiado costoso y complicado para su uso en diagnósticos veterinarios, y aún no se ha evaluado como ensayo de diagnóstico en animales de producción (da Silva *et al.*, 1999).

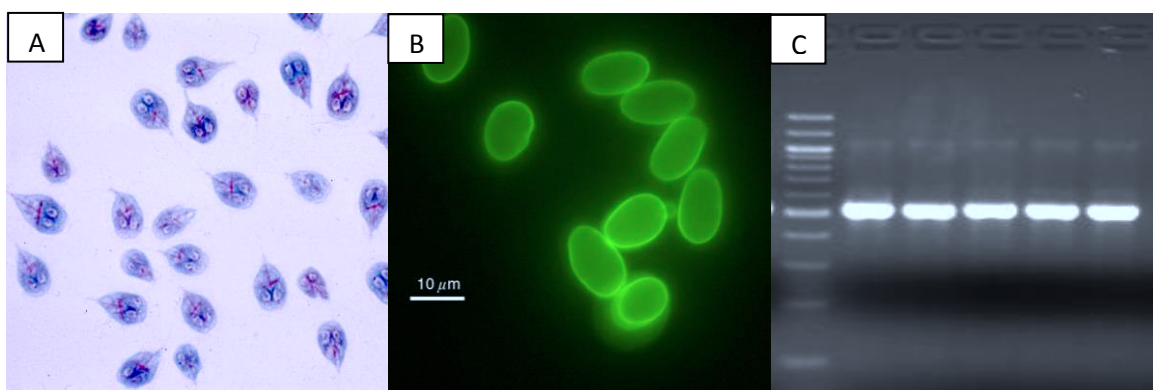


Figura 10. Diagnóstico de *Giardia*. (A) Tinción de trofozoitos con colorante Giemsa en muestras fecales. (B) Inmunofluorescencia (IFA), detección de quistes de *Giardia* con el uso del kit Merifluor. (C) Diagnóstico molecular (PCR).

2.7. Tratamiento y control

Varios compuestos tienen una eficacia conocida contra *Giardia*, tanto *in vitro* como en animales de laboratorio. Para ovejas, cabras y cerdos, no hay estudios disponibles sobre la eficacia del tratamiento contra *Giardia*. En terneros, una serie de estudios evaluaron la eficacia de diferentes compuestos, tanto en modelos experimentales y en condiciones naturales. En la actualidad, no existe una droga aprobada para el tratamiento de la giardiasis en los rumiantes (Geurden *et al.*, 2010).

2.7.1. Tratamiento quimioterapéutico

Los Nitroimidazoles (NZS) como el metronidazol, tinidazol, quinacrina o furazolidona se utilizan con frecuencia para tratar la giardiasis en pacientes humanos. Aunque el tratamiento con estos compuestos es efectivo, pueden ocurrir considerables efectos secundarios. El metronidazol es aún considerado como carcinógeno (Morgan *et al.*, 1993; Harris *et al.*, 2001). Además, la resistencia al tratamiento ha sido descrita para el metronidazol y furazolidona. En medicina veterinaria el metronidazol y dimetridazol se han utilizado en animales de compañía y en el ganado, lográndose una mejoría sintomática (Upcroft *et al.*, 1990; Xiao *et al.*, 1993). Datos sobre la reducción de la excreción de quistes no son disponibles. Además, en varios países de la Nueva Zelanda ya no son aprobados para su uso en el ganado. Más recientemente, la nitazoxanida se ha demostrado *in vitro* como una droga nueva y prometedora contra *Giardia*, pero no hay datos sobre la actividad *in vivo* en animales de producción (Cedillo-Rivera *et al.*, 2002). En el ganado y otros animales de producción, los compuestos de benzimidazol o paromomicina son actualmente considerados como los más adecuados para el tratamiento de la giardiasis (Xiao *et al.*, 1996; Geurden *et al.*, 2010).

2.7.1.1. Benzimidazoles

Una opción para el tratamiento de la giardiasis son los compuestos de benzimidazol (BZ), que son bien conocidos como antihelmínticos de amplio espectro. Los BZ se cree que tienen un margen de seguridad alta y una toxicidad selectiva (Xiao *et al.*, 1996). Estudios *in vitro* indican que los BZ son más eficaces contra *Giardia* que el metronidazol o tinidazol y que este efecto anti-*Giardia* es irreversible (Edlind *et al.*, 1990; Morgan *et al.*, 1993). Los BZ interfieren con la polimerización de la tubulina, que

es un componente importante de las estructuras del citoesqueleto del trofozoítos de *Giardia*. Por lo tanto, todas las actividades funcionales dependientes de las estructuras de la tubulina, tales como el cuerpo medio y el disco ventral. Como resultado, los BZs interfieren con la adhesión del trofozoíto a la mucosa intestinal y por tanto, previenen la colonización intestinal. Los BZs parece no afectar a la tubulina flagelar, que tiene una estructura diferente de la tubulina del cuerpo medio y el disco ventral(Clark y Holberton, 1988).

El uso de albendazol y fenbendazol en terneros ha demostrado una reducción en la excreción de quistes y (Xiao *et al.*, 1996; O'Handley *et al.*, 2000a). Se ha demostrado que el fenbendazol reduce significativamente el pico y la duración de la excreción de quistes y que resulta en un beneficio clínico (O'Handley *et al.*, 1997; O'Handley *et al.*, 2000a). Sin embargo, la dosis requerida de los dos BZs para el tratamiento de *Giardia* va de 5-20 mg/kg de peso vivo, por otra parte el tratamiento es por tres días consecutivos, siendo mayor en comparación con el tratamiento de helmintos.

Para prevenir la reinfección proveniente del medio ambiente y para mejorar a largo plazo los parámetros de producción, se ha planteado que los terneros deben ser tratados con una dosis baja continua de BZs, ya que la duración del tratamiento parece ser más importante que la dosis de tratamiento (O'Handley *et al.*, 2000a; O'Handley *et al.*, 1997). Sin embargo, puede haber un riesgo para el desarrollo de cepas resistentes a BZs de *Giardia* en campo.

2.7.1.2. Paromomicina

Paromomicina o aminosidina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro que presenta una eficacia contra diversos protozoarios parásitos, como el *Cryptosporidium* en los terneros (Fayer y Ellis, 1993; Viu *et al.*, 2000), *Histomonas meleagridis* en pavos (Hu y McDougald, 2004) y *Giardia* en ratas y humanos (Awadalla *et al.*, 1995; Wright *et al.*, 2003). Paromomicina se une a la subunidad pequeña de rRNA (small subunit rRNA) e inhibe la síntesis de proteínas, esto resulta en un efecto directo en *Giardia* o un efecto indirecto debido a la retirada de nutrientes causada por la inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas y la destrucción de la

flora bacteriana (Edlind *et al.*, 1990; Harris *et al.*, 2001). Paromomicina no se absorbe en el tracto gastrointestinal y por lo tanto, es bien tolerado por los terneros (Grinberg *et al.*, 2002). Se ha demostrado que la paromomicina reduce eficazmente la excreción de quistes de *Giardia* en terneros infectados experimentalmente durante al menos 2 semanas, cuando se administra 50 y 75 mg/kg/día durante cinco días consecutivos (Geurden *et al.*, 2006a). En otros animales de producción, no hay datos experimentales sobre la eficacia de la paromomicina.

2.7.2. Enfoques alternativos

Se ha demostrado que varios compuestos de origen vegetal afectan el crecimiento del parásito, la capacidad de adherencia y la morfología *in vitro*, por ejemplo la curcuma (*Curcuma longa*) y la menta (*Mentha* sp.) (Perez-Arriaga *et al.*, 2006; Vidal *et al.*, 2007). En ratones, los extractos de plantas medicinales utilizadas en medicina tradicional mexicana, mostraron una eficacia contra los trofozoítos de *Giardia* (Barbosa *et al.*, 2006). Sin embargo, hasta la fecha no han sido evaluados en animales de producción criado en condiciones naturales, con una exposición continua de los animales a la infección. El enfoque alternativo más prometedor es probablemente la vacunación.

2.7.2.1. Vacunación

La vacunación podría proporcionar una alternativa para el tratamiento de la quimioterapia, logrando una protección prolongada contra la infección y la prevención de la excreción de quistes con el fin de romper la transmisión mediante la reducción de la contaminación ambiental. En los Estados Unidos, una vacuna contra *Giardia* se encuentra disponible comercialmente para su uso en perros y gatos (Fel-OVax *Giardia* o *Giardia* Vax, Fort Dodge Animal Health), pero la eficacia preventiva o curativo de la vacuna parece ser variable (Olson *et al.*, 2000; Payne *et al.*, 2002; Stein *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 2004). En terneros, la vacunación se produjo una mayor respuesta inmune humoral, sin embargo no se redujo la excreción de quistes y el número de trofozoítos intestinales, y por tanto no se evitaron los signos clínicos (Uehlinger *et al.*, 2007).

Varios puntos deben tenerse en cuenta en cuanto a la vacuna contra *Giardia* en lo que se refiere a los animales de producción. Actualmente, la vacuna está compuesta de sonicated de trofozoítos y su elaboración es muy complicada. Por lo tanto, el uso de una vacuna recombinante que contiene uno o más antígenos protectores pudiera ser una nueva alternativa (Olson *et al.*, 2000).

Algunas proteínas de *Giardia* son ensamblaje-específicos, mientras que otros son comunes para todos los ensamblajes (Steuart *et al.*, 2008). A pesar que han sido propuesto varios antígenos de *Giardia* como candidatos potenciales para la vacuna, se necesita más investigación para identificar las proteínas que comúnmente se expresa en todas los ensamblajes (Olson *et al.*, 2000; Abdul-Wahid y Faubert, 2007).

Se ha demostrado serológicamente que el aumento de los anticuerpos no se correlaciona con la protección contra la infección, una respuesta inmune local junto con los mecanismos celulares parece ser esencial para prevenir la colonización por trofozoitos de *Giardia* en el intestino (Yanke *et al.*, 1998; O'Handley *et al.*, 2003; Muller y von Allmen, 2005). Por lo tanto, la vacunación a través de una inyección subcutánea de un antígeno no puede ser una vía adecuada para inducir la respuesta inmune localizada en el lumen del intestino delgado del hospedador (Uehlinger *et al.*, 2007). En ratones, la inmunización oral con un vector vivo que expresa una proteína de la pared del quiste de *Giardia* resultó en una reducción significativa en la excreción de quistes (Lee y Faubert, 2006).

Otro punto importante es el momento óptimo de vacunación, que debería ser considerado. En terneros, los picos de excreción de quistes se dan entre las 2-5 semanas de edad, y los signos clínicos se observan en los animales de 2-4 semanas de edad. Por lo tanto, es necesaria una vacunación temprana para disminuir la excreción de quistes, resultando en una disminución de la contaminación ambiental y prevención de signos clínicos (Olson *et al.*, 2000; Geurden *et al.*, 2010). Sin embargo, los anticuerpos maternos pueden interferir con el desarrollo de la inmunidad en los animales recién nacidos, por lo que es incierto si una respuesta inmune protectora se puede lograr mediante la inmunización activa a partir del nacimiento (Chase *et al.*, 2008). La

inmunización pasiva mediante la inyección con un antígeno de protección y por la transferencia de anticuerpos protectores a través de la leche es otra opción. Los títulos de anticuerpos anti-*Giardia* más alto se han encontrado en el calostro de las vacas lecheras. Estos anticuerpos muestran la capacidad de impedir la adherencia del trofozoíto de *Giardia* (O'Handley *et al.*, 2003).

2.8. Control

2.8.1. Medidas de soporte al tratamiento

Aunque los compuestos tales como el fenbendazol, albendazol y paromomicina son eficaces contra *Giardia*, la mayoría de los terneros vuelven a excretar quistes dentro de 2-3 semanas después del tratamiento. Esto es debido a que los quistes de *Giardia* pueden sobrevivir durante una semana en las heces de ganado y hasta 7 semanas en el suelo, el período de tratamiento efectivo de la mayoría de los protocolos (3-5 días) puede ser demasiado corto para prevenir la reinfección de una contaminación del ambiente poco después del tratamiento (Geurden *et al.*, 2010).

Los quistes de *Giardia* son conocidas por ser resistentes a los desinfectantes de uso común, tales como el cloro. Desinfectantes como el dióxido de cloro, el ozono y la radiación ultravioleta han sido los focos de la investigación en los procesos de tratamiento de agua potable, aunque hay objeciones prácticas contra la mayoría de estos procedimientos de desinfección para su uso en las instalaciones. Por otra parte, el calor o desecación y la desinfección con amonio cuaternario pueden ser utilizados en las instalaciones de agua potable (Xiao *et al.*, 1996; O'Handley *et al.*, 1997; Geurden *et al.*, 2010). En un estudio reciente, la eficacia de una combinación de tratamiento de animales con fenbendazol, saneamiento ambiental y la desinfección con amoniaco al 10% se evaluó en las granjas lecheras comerciales y se logró una reducción significativa tanto en el número de terneros infectados y en el número de quistes excretados. La presión de la infección del medio ambiente se redujo así de forma efectiva rompiendo el ciclo de transmisión de *Giardia*, lo que resulta en una eficacia del tratamiento a largo plazo (Geurden *et al.*, 2006).

2.8.2. Medidas para prevenir la infección

Como se mencionó anteriormente, las medidas de gestión son fundamentales para lograr una mejoría clínica en un régimen de tratamiento curativo. Del mismo modo para la prevención de la infección, el manejo adecuado puede contribuir a una disminución de la tasa de infección, y su objetivo es romper el ciclo del parásito a través de medidas específicas de lucha contra la capacidad del parásito de propagarse fácilmente. Estas medidas incluyen el manejo de un bajo número de ganados y el continuo aseo (cambio) de la cama del ganado, combinado con la limpieza regular y desinfección de las instalaciones de la vivienda (Bomfim *et al.*, 2005; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006). Un punto importante son los sistemas de producción tecnificados con corrales, debido a que los animales criadores en casa son tres veces más probables de contraer la infección que los criados afuera (Ruest *et al.*, 1997; Maddox-Hyttel *et al.*, 2006). Además, un adecuado manejo del calostro puede ayudar a prevenir la aparición de la enfermedad clínica y una infección en menor medida, a través de la transferencia pasiva de inmunoglobulinas específicas (Godden, 2008). Estudios demuestran que el calostro es un elemento protector en terneros, a diferencia que en corderos (Xiao y Herd, 1994).

El tratamiento preventivo contra la giardiasis no es una buena opción, debido a que los animales pueden infectarse en corto tiempo después del tratamiento. El tratamiento preventivo es utilizado con éxito para prevenir la coccidiosis en terneros (Daugeschies *et al.*, 2007). Sin embargo, el período de 2-3 semanas de prepatencia y la esporulación de 3-10 días de los ooquistes de *Eimeria* aumento gradualmente la contaminación del medio ambiente, en comparación con *Giardia*. Como los quistes de *Giardia* son inmediatamente infecciosos en la excreción y el período prepatente es sólo 3-5 días, la contaminación del medio ambiente se incrementa rápidamente, y por tanto el tratamiento preventivo probablemente no funcionaría para prevenir la giardiasis (Daugeschies *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Diseño de estudio

El presente trabajo se determinó la presencia de *E. bienewsi* y *G. duodenalis* en heces de crías de alpacas de no más de 30 días de edad, provenientes de los departamentos de Cuzco, Puno y Huancavelica. Con este fin, se utilizó las muestras fecales positivas a *Cryptosporidium* provenientes de un estudio Caso-Control que se diseñó para determinar el papel del *Cryptosporidium* como factor de riesgo para la presentación de diarrea en alpacas de no más de 30 días de edad. La técnica molecular PCR y el secuenciación del ADN se utilizarán para el diagnóstico y la caracterización molecular de *E. bienewsi* y *G. duodenalis* respectivamente.

1.2. Lugar de estudio

Las muestras fecales utilizadas en el presente trabajo provienen de animales que se utilizaron en un estudio sobre criptosporidiosis en alpacas de no más de 30 días de edad, provenientes de los departamentos de Cuzco, Puno y Huancavelica, situados en la sierra sur y central del Perú. El período de muestreo fue durante la temporada de parición de alpacas, entre los meses de Enero y Marzo del 2007.

1.3. Número de muestras

Se analizaron 126 muestras (65 hembras, 61 machos) de heces de crías de alpaca (37 de Cuzco, 29 de Puno y 60 de Huancavelica). De acuerdo a la consistencia de las heces se clasificaron en diarreicas (líquidas y pastosas) (n = 30) y en normales (n = 96).

2. Métodos

2.1. Colecta y conservación de las muestras

Las muestras fueron recolectadas directamente del recto del animal mediante bolsas plásticas debidamente rotuladas. Posteriormente, las muestras fueron conservadas en una solución de bicromato de potasio al 2,5% (V/V) y almacenadas en refrigeración a 4°C. Las muestras se remitieron al Laboratorio de Microbiología y Parasitología Veterinaria (Sección Parasitología- Lab. de Inmunoparasitología) de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Posteriormente, 126 muestras fueron diagnosticadas como positivas a *Cryptosporidium* sp. mediante la coloración de Ziehl Neelsen Modificado. Estas muestras fueron enviadas al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC por sus siglas en inglés de Centers for Disease Control and Prevention), División de Parasitología (DPD) en Atlanta, Georgia, donde fueron procesadas, para buscar la posible presencia de *E. bieneusi* y sus genotipos, así como *G. duodenalis* y sus ensamblajes mediante el estudio molecular respectivo.

2.2. Técnicas moleculares

Para el estudio molecular se realizó la extracción de ADN por cada una de las muestras fecales, usando el Kit comercial FastDNA®SPIN Kit (For Soil) (Jiang *et al.*, 2005). Posteriormente se realizó un PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando Cebadores (iniciadores, partidores o primers en inglés) según lo descrito por Sulaiman *et al.* (2003a, 2003b), tres PCR por muestra de ADN para *E. bieneusi* y dos PCR por muestra de ADN para *G. duodenalis*. Todos los productos de PCR de las muestras positivas fueron secuenciadas para identificar el genotipo y ensamblaje de los parásitos respectivamente.

2.3. Extracción de ADN usando la técnica FastDNA® SPIN Kit (For Soil)(Jiang *et al.* 2005).

La extracción de ADN se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (Anexo 2), cada kit está diseñado para 50 extracciones de ADN. El ADN se mantuvo preservado en congelación a -20°C.

2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Nested-PCR) para la detección de *E. bieneusi*.

Las muestras de ADN fueron analizadas con la secuencia del ITS (por sus siglas en inglés de Internal Transcribed Spacer) del gen ARN ribosomal de *E. bieneusi*, usando el protocolo descrito por Sulaiman *et al.* (2003a). Con este protocolo se amplificara la secuencia completa de la region ITS (243 pb).

Reactivos para el PCR-Anidado:

1. Cebadores (Primers) para PCR Primario (Outers):
 - a. *E. bieneusi* Forward (F1): 5'- GAT GGT CAT AGG GAT GAA GAG CTT -3'
 - b. *E. bieneusi* Reverse (R1): 5'- TAT GCT TAA GTC CAG GGA G -3'
2. Cebadores (Primers) para PCR Secundario (Inners):
 - a. *E. bieneusi* Forward (F2): 5'- AGG GAT GAA GAG CTT CGG CTC TG -3'
 - b. *E. bieneusi* Reverse (R2): 5'- AGT GAT CCT GTA TTA GGG ATA TT -3'
3. Tampón PCR Gene Amp 10X, Producto No. N8080129, AB Applied Biosystems, Foster City, CA.
4. dNTP 100 mM, Producto No. U1410, Promega, Madison, WI. Preparar la solución de trabajo a 1.25 mM. Para esto añadir 12.5 µL de cada dNTP a 950 µL de agua destilada. Mezclar y guardar la solución de trabajo a -20C antes de usarlo.
5. Polimerasa ADN GoTaq® (DNA polymerase), Producto No. M30005, Promega, Madison, WI.
6. MgCl₂ 25 mM, Producto No. A351F, Promega, Madison, WI.
7. Agua destilada estéril, libre de ADNasas

Protocolo:

I. PCR Primario:

A. Preparación del “master mix” (mezcla de reactivos para PCR). Para cada reacción de PCR se preparará lo siguiente:

Tampón AB PCR 10X	10 µL
dNTP (1.25 mM)	16 µL
Cebador (primer) F1 (40 ng/ µL)	2,5 µL
Cebador (primer) R1 (40 ng/ µL)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL
Albúmina sérica bovina (10 mg/ml)	4,0µL
Agua destilada	56,5 µL
Polimerasa Taq	0,5 µL
Total	98 µL

B. Añadir 98 µL de la solución “master mix” en cada tubo de PCR.

C. Añadir 2 µL de la muestra de ADN en cada tubo.

D. Usar el Termociclador con el programa para PCR siguiente:

Pre-Inicialización: 94 °C/3 minutos

Inicialización, Desnaturalización y Anillado en 35 ciclos de: 94 °C/45 segundos,
55 °C/45 segundos y 72 °C/1 minuto

Elongación final: 72 °C/7 minutos

Conservación: 4 °C infinito

II. PCR Secundario

A. Preparación del “master mix”. Para cada reacción de PCR, preparar lo siguiente:

Tampón AB PCR 10X	10 µL
dNTP (1.25 mM)	16 µL
Cebador (primer) F2 (40 ng/ µL)	5 µL
Cebador (primer) R2 (40 ng/ µL)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL
Agua destilada	53,5 µL

Polimerasa Taq	0,5 µL
Total	96 µL

- B. Añadir 96 µL de la solución “master mix” en cada tubo de PCR.
- C. Añadir 4 µL de la muestra de ADN en cada tubo.
- D. Usar el Termociclador con el programa para PCR siguiente:
- Pre-Inicialización: 94 °C: 3 minutos
- Inicialización, Desnaturalización y Anillado en 35 ciclos de: 94 °C/45 segundos, 55 °C/45 segundos y 72 °C/1 minuto
- Elongación final: 72 °C/7 minutos
- Conservación: 4 °C infinito
- E. Correr 20 µL del producto de PCR en electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 %.
- F. El resultado positivo dará una banda de 392 pb.

2.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa Anidada (Nested-PCR) para la detección de *G. duodenalis*.

Las muestras de ADN fueron analizadas con el gen “Triosephosphate isomerase” (TPI) para *G. duodenalis* usando el protocolo descrito por Sulaiman *et al.* (2003b)

Reactivos para el PCR-Anidado:

- 1) Cebadores (Primers) para PCR primario (Outers):
 - b. Giardia Forward (F1): 5'- AAT AAA TIA TGC CTG CTC GTC G -3'
 - c. Giardia Reverse (R1): 5'- ATG GAC ITC CTC TGC CTG CTC -3'
- 2) Cebadores (Primers) para PCR secundario (Inners):
 - a. Giardia Forward (F2): 5'- CCC TTC ATC GGI GGT AAC TTC AA -3'
 - b. Giardia Reverse (R2): 5'- GTG GCC ACC ACI CCC GTG CC -3'
- 3) Tampón PCR Gene Amp 10X, Producto No. N8080129, AB Applied Biosystems, Foster City, CA.

- 4) dNTP 100 mM, Producto No. U1410, Promega, Madison, WI. Preparar la solución de trabajo a 1,25 mM. Para esto añadir 12,5 µL de cada dNTP a 950 µL de agua destilada. Mezclar y guardar la solución de trabajo a -20°C antes de usarlo.
- 5) Polimerasa ADN GoTaq® (DNA polymerase), Producto No. M30005, Promega, Madison, WI.
- 6) MgCl₂ 25 mM, Producto No. A351F, Promega, Madison, WI.

Protocolo

I. PCR Primario:

A. Preparación del “master mix”. Para cada reacción de PCR se prepara lo siguiente:

Tampón AB PCR 10X	10 µL
dNTP (1.25 mM)	16 µL
Cebador (primer) F1 (40 ng/ µL)	2,5 µL
Cebador (primer) R1 (40 ng/ µL)	2,5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL
Albúmina sérica bovina (10 mg/ml)	4,0µL
Agua destilada	56,5 µL
Polimerasa Taq	0,5 µL
Total	98 µL

B. Añadir 98 µL de la solución “master mix” en cada tubo de PCR.

C. Añadir 2 µL de la muestra de ADN en cada tubo.

D. Usar el Termociclador con el programa para PCR siguiente:

Pre-Inicialización: 94 °C: 3 minutos

Inicialización, Desnaturalización y Anillado 35 ciclos de: 94 °C/45 segundos,
50 °C/45 segundos y 72 °C/1 minuto

Elongación final: 72 °C/7 minutos

Conservación: 4 °C infinito

II. PCR Secundario

A. Preparación del “master mix”. Para cada reacción de PCR preparar lo siguiente:

Tampón AB PCR 10X	10 µL
dNTP (1.25 mM)	16 µL
Cebador (primer) F2 (40 ng/ µL)	5 µL
Cebador (primer) R2 (40 ng/ µL)	5 µL
MgCl ₂ (25 mM)	6 µL
Agua destilada	53,5 µL
Polimerasa Taq	0,5 µL
<hr/>	
Total	96 µL

B. Añadir 96 µL de la solución “master mix” en cada tubo de PCR.

C. Añadir 4 µL de la muestra de ADN en cada tubo.

D. Usar el Termociclador con el programa para PCR siguiente:

 Inicialización, Desnaturalización y Anillado 35 ciclos de: 94 °C/45 segundos,

 50 °C/45 segundos y 72 °C/1 minuto

 Elongación final: 72 °C/7 minutos

 Conservación: 4 °C infinito

E. Realizar la electroforesis sobre un gel de agarosa al 1,5 % con 20 µL del producto de PCR.

F. El resultado positivo dará una banda de 530 pb.

2.6. Secuenciación de ADN de los productos amplificados.

Se utilizó el producto limpio del PCR amplificado del gen seleccionado para ser secuenciado.

2.6.1. Limpieza del producto de PCR (limpieza de sales y del cebador).

La limpieza del producto PCR secundario del gen seleccionado fue limpiada usando el kit Montage PCR.

Componentes del kit:

Componente	Nombre	Cantidad
Vial de centrifugación	Spin vial	250 tubos
Recipiente de lavado	Sample reservoir	500 unidades

Protocolo:

- Insertar el recipiente de lavado dentro del vial de centrifugación del *kit* (color púrpura hacia arriba y blanco hacia adentro).
- Pipetear 400 µL de agua destilada dentro del recipiente de lavado. Añadir 100 µL del producto de PCR. Tapar y centrifugar a 1000xg durante 15 minutos.
- Remover el recipiente de lavado y colocar en un nuevo vial de centrifugación (color púrpura hacia arriba).
- Añadir 20 µL de agua, previamente calentada a 60 °C.
- Invertir el recipiente de lavado (color blanco hacia arriba y púrpura hacia adentro) y centrifugar a 1000xg durante 2 minutos.
- Guardar el producto de PCR limpio.

2.6.2. Reacción del ciclo-secuenciación

Se usó el kit de secuenciación de ADN “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit”. Applied Biosystems, para su uso en el analizador “3100 AB Prism Genetic Analyzer” (para la nueva versión V3.1).

1. Componentes del kit:

Componente	Nombre	Cantidad
Colorante	ABI Prism® BigDye® Terminator v3.1	1 tubo
Templado Control	pGEM® -3Zf(+) Control Template, 0.2ug/ul	1 tubo
Cebador Control	21 M13 Control Primer (forward), 0.8pmol/ul	1 tubo

2. Solución tampón de secuenciación

<i>BigDye terminator buffer</i> (para 10ml):	Cantidad
Tris (200mM Tris pH=9.0)	2ml
MgCl (5mM MgCl)	2ml
Agua destilada	6ml

Protocolo:

- a) Preparar 2 “master mix” para secuenciación (*uno para el Cebador *Forward* y otro para el Cebador *Reverse*).

Tampón <i>BigDye terminator</i>	4 µL
Colorante <i>BigDye Terminator</i>	1 µL
Cebador	2 µL, *
Agua	12,5 µL
Producto de PCR limpio	0,5 µL

- b) Usar el termociclador en 25 ciclos con las siguientes condiciones:
96 °C/10 segundos, 50 °C/5 segundos, 60 °C/4 minutos.

2.6.3. Purificación

Este paso se realizó con el fin de purificar de impurezas los productos del ciclo Secuenciación. Para eso se utilizó el kit Centrisep spin Columns. Princeton Separations.

Componentes del kit:

Componente	Nombre	Cantidad
Columnas	CENTRI-SEP columns containing dry gel	100 unidades
Tubo de lavado	Wash tubes, 2ml	100 unidades
Tubo colector	Sample Collection Tubes, 1,5ml	100 unidades

Protocolo

- a. Hidratar las columnas que serán usadas, añadiendo 0.8ml de agua destilada, tapar, homogenizar en el agitador, remover las burbujas y dejar reposar un mínimo de 30 minutos.
- b. Quitar la tapa y remover el exceso de fluido mediante decantación. Remover el botón de la parte inferior de la columna, colocar las columnas en sus tubos colectores y centrifugar a 750xg durante 3 minutos (3,000rpm).
- c. No se debe perder de vista la posición y orientación de la columna con respecto a la fuerza gravitacional, por lo tanto en la próxima centrifugación las columnas se deben poner en la misma orientación.
- d. Transferir 20 µL de la amplificación del ciclo Secuenciación encima de la matriz de cada columna Centri-Sep, sin deteriorar el gel y sin tocar las paredes del tubo.
- e. Coloque la columna cargada en un tubo colector, con la orientación apropiada de la columna. Centrifugar a 750xg (3000 rpm) durante 3 minutos.
- f. Centrifugar la muestra es una centrífuga de vacío. Guardar en el congelador.

2.6.4 Pasos previos al funcionamiento en el secuenciador

La secuenciación de las muestras se realizó siguiendo las instrucciones de los fabricantes del Secuenciador ABI 3100 (*automated sequencer*) (Perkin-Elmer).

Añadir 15 µL de HIDI Formamida (Hi-Di™ Formamide), Catalogo No. 4311320, Applied Biosystems, en los tubos con el ADN deshidratado. Transferir a una placa de secuenciación de 96 pozos (MicroAmp Optical, Catalogo No. N801-0560, Applied Biosystems), colocar la tapa o placa Septa (3100 Genetic Analyzer Plate Septa 96-well, Catalogo No. 4315933, Applied Biosystems). Calentar a 94 °C durante 3 minutos. Luego, colocar inmediatamente en el congelador durante 3 minutos, como mínimo. Colocar en el secuenciador. Se usará el Secuenciador ABI 3100 (Perkin-Elmer).

2.7. Análisis de secuencias.

Las secuencias de los nucleótidos obtenidas fueron analizadas usando el Programa “Software Chromas lite” versión 2.0 (<http://www.techne.lysium.com.au>) y comparadas con las referencias de secuencias provenientes de la base de datos del GenBank, usando el BlastN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el Programa “Software

Clustal W” (<http://align.genome.jp/>). El análisis filogenético se realizó usando el Programa “Software TreeConW” (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/software>), midiendo la distancia evolutiva inferida desde la secuencia de nucleótidos. Las distancias genéticas fueron calculadas de acuerdo a los parámetros propuestos por Kimura (Tamura *et al.*, 2004, 2007). Todas las secuencias obtenidas serán inscritas en el GenBank.

2.8. Análisis estadístico.

La asociación de presencia del parásito con la presencia de diarrea y sexo fue analizada usando la prueba de χ^2 . Así mismo, se calculó el Odds Ratio con sus respectivos intervalos de confianza. El análisis estadístico para evaluar estos factores se realizó usando el programa STATA 10 ®.

IV. RESULTADOS

De las 126 muestras fecales analizadas, 65 (51,6%) resultaron ser positivas a *E. bieneusi* mediante la prueba de PCR (Figura 11, Cuadro 3). La infección en animales fue mayor en hembras (n = 35) que en machos (n = 30), no se encontró asociación estadística entre la presencia del parásito frente al sexo ($p > 0,01$). Así mismo, no se halló ninguna asociación entre la infección por *E. bieneusi* y la ocurrencia de diarrea (Cuadro 4).

La diversidad genética de los aislamientos de *E. bieneusi* se calculó por múltiples alineaciones de las secuencias de nucleótidos de la región ITS del gen rRNA (Figura 12). Por lo tanto, se realizó la secuenciación de los nucleótidos de la región ITS, generados para las 65 muestras positivas a PCR. El análisis de secuencias reveló diferencias para algunos de los aislamientos, hallándose al menos 10 genotipos distintos de *E. bieneusi* dentro de estas cepas de crías de alpacas (Cuadro 3). Así mismo, seis de los aislamientos corresponden a nuevos genotipos, los cuales han sido denominados ALP1, ALP2, ALP3, ALP4, ALP5 y ALP6, respectivamente (Figura 12).

Se realizó el análisis filogenético para comprender la relación genética entre los genotipos de *E. bieneusi*. Se construyó un árbol filogenético a partir de las secuencias de los aislamientos de *E. bieneusi* de alpacas del presente trabajo, y algunas secuencias de *E. bieneusi* de humanos y animales registrados en Santín y Fayer (2011) (Figura 13). En el árbol filogenético pudo observarse dos grupos filogenéticamente relacionados, uno conformado por los genotipos ALP2, ALP5 y BEB6, y el segundo por los genotipos ALP1, ALP3, ALP4, ALP6, TypeIV, P y D (Figuras 13, 14 y 15). Un grupo importante

fue evidente a partir de estos datos combinados (n = 55 genotipos). Este grupo consistía en un aislamiento de *E. bienesi* previamente reportados de llama (P), y dos nuevos genotipos (ALP1 y ALP2). Dentro de este grupo, algunos aislamientos de alpacas (n = 5) fueron idénticos a un genotipo de *E. bienesi* publicado en el GenBank para una llama, el genotipo P (GenBank N ° AF267146). Por otra parte, 49 correspondían al genotipo ALP1, y uno correspondía al genotipo ALP2.

Cuadro 3. Genotipos de *Enterocytozoon bienesi* identificados en crías de alpacas por la secuencia del ITS.

Genotipo	Departamento			Total	%
	Cuzco	Puno	Huancavelica		
P	4	0	1	5	7.7
Type IV	3	0	1	4	6.2
D	0	0	2	2	3.1
Beb6	0	0	1	1	1.5
ALP1	5	27	16	48	73.8
ALP2	0	0	1	1	1.5
ALP3	0	0	1	1	1.5
ALP4	0	0	1	1	1.5
ALP5	0	0	1	1	1.5
ALP6	0	0	1	1	1.5
Total	12	27	26	65	100.0

Cuadro 4. Relación entre *E. bieneusi* y *G. duodenalis* con las variables presentación de diarrea y sexo en crías de alpacas.

		Con diarrea		Sin diarrea		Total	p*
		n	%	n	%		
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Positivos	15	23.1	50	76.9	65	0.765
	Negativos	15	26.3	46	80.7	61	
<i>Giardia duodenalis</i>	Positivos	10	23.8	32	76.2	42	0.849
	Negativos	20	23.8	64	76.2	84	

		Machos		Hembras		Total	p*
		n	%	n	%		
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Positivos	30	44.6	35	55.4	65	0.486
	Negativos	31	50.8	30	49.2	61	
<i>Giardia duodenalis</i>	Positivos	23	70.8	19	29.2	42	0.780
	Negativos	38	62.3	46	37.7	84	

*La prueba de Chi² no mostró asociación significativa.

Figura 11. Especifico diagnóstico de *Enterocytozoon bieneusi* median PCR anidado basados en la región ITS. Muestras positivas con una banda de aproximadamente 392 pb.

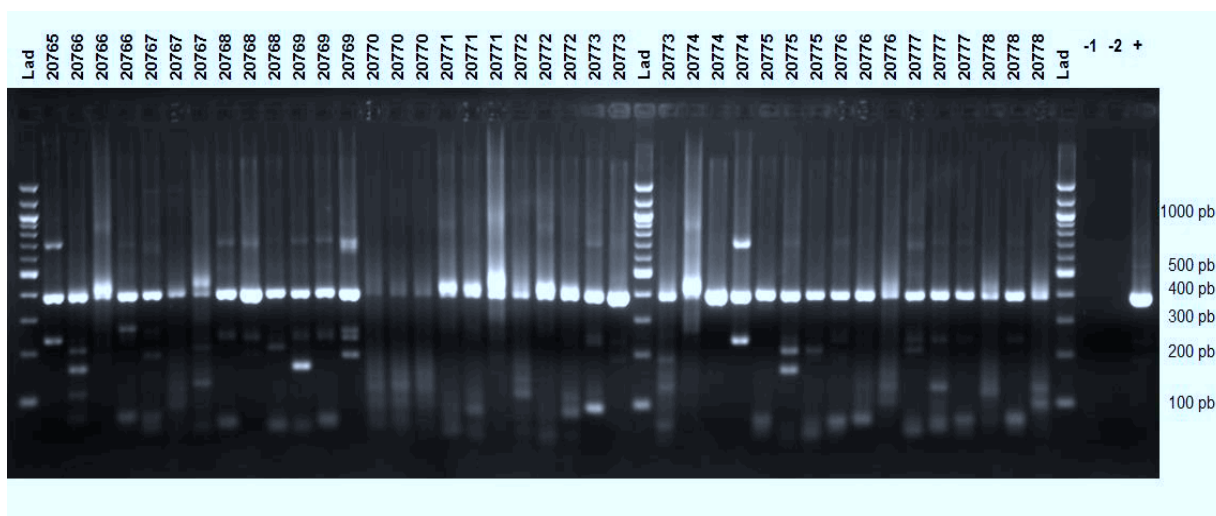


Figura 12. Variación de la región ITS del gen rRNA de *Enterocytozoon bieneusi* aislados de crías de alpacas. Seis genotipos distintos (ALP1-ALP6) de *E. bieneusi* basadas en estas secuencias fueron evidentes.

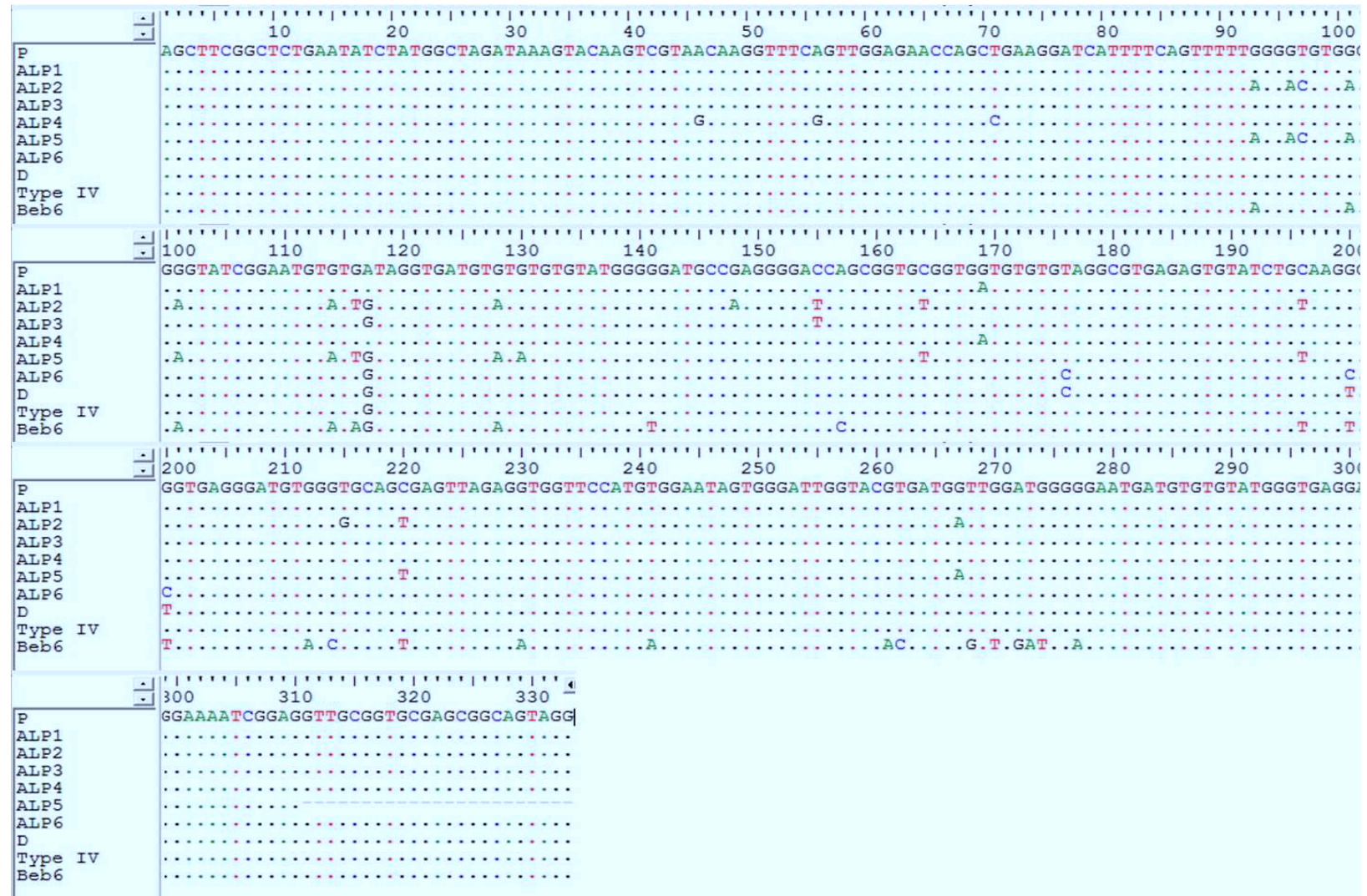
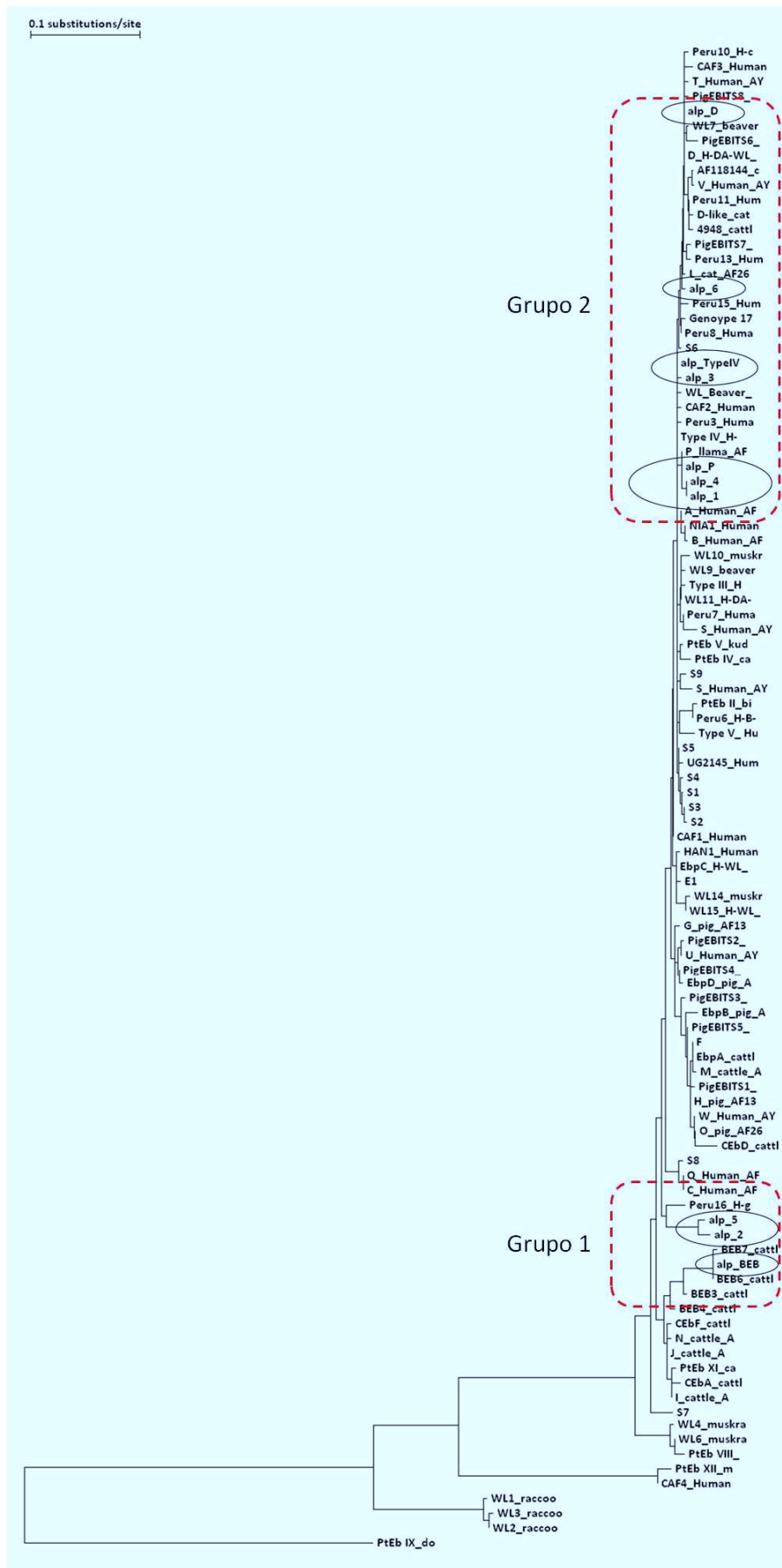


Figura 13. Asociación filogenética de genotipos de *Enterocytozoon bienewisi* identificados en crías de alpacas y otros genotipos inscritos en el GenBank (Santin y Fayer, 2011).



Del mismo modo, las secuencias del ITS de algunos aislamientos de alpacas (n = 7) fueron idénticas a las secuencias de *E. bieneusi* de seres humanos y animales, dos crías fueron idénticas al genotipo D, cuatro crías fueron idénticas al genotipo de tipo IV, y uno era idéntica al genotipo BEB6 (GenBank N ° AF101200, AF242478, y EU153584), respectivamente. Las secuencias de nucleótidos de cinco aislamientos de crías eran diferentes en porcentaje de divergencia, así como en identidad a todas las secuencias de *E. bieneusi* registradas en el GenBank. Por lo tanto, cada una de ellas fue considerada como nuevos genotipos. Estas secuencias fueron nombradas como ALP2, ALP3, ALP4, ALP5 y ALP6 (Anexo 3). Estos genotipos mostraron una divergencia de 6.17% en ALP2, 9.82% en ALP3, 1.65% en ALP4, 4.11% en ALP5 y 1.65% en ALP6, respectivamente.

En lo que respecta la zona geográfica, los aislamientos de alpacas de la región Puno fueron infectados únicamente con el genotipo ALP1. Las crías de alpaca provenientes de Cuzco estaban infectadas con tres genotipos de *E. bieneusi*: ALP1, P, y Tipo IV. Los aislamientos de alpacas de Huancavelica presentaron la mayor diversidad de genotipos. Las alpacas de esta región fueron infectadas con todos los genotipos reportados en el presente estudio (Cuadro 3).

Con lo que respecta a *Giardia*, del total de las muestras analizadas (n=126) mediante PCR para la detección de *Giardia*, 42 fueron positivas (Figura 16, Cuadro 5). El porcentaje de infección por *Giardia* en crías de alpacas fue de 33% y fue detectada en todas las regiones geográficas donde las alpacas fueron muestreadas. Las alpacas machos tuvieron una infección ligeramente alta en comparación con las alpacas hembras (37.7% versus 29.2%), sin embargo el análisis estadístico no mostró diferencias estadísticamente significativa ($p>0.01$). Así mismo, no se observó asociación entre la infección por *Giardia* y presencia de diarrea (OR=1.0; $p>0.01$) (Cuadro 4).

Figura 14. Asociación filogenética de genotipos de *Enterocytozoon bienewisi* identificados en crías de alpacas “**Grupo 1**” (Genotipos ALP2, ALP5 y BEB6) y otros genotipos inscritos en el GenBank (Santin y Fayer, 2011). Escala: sustituciones/sitio.

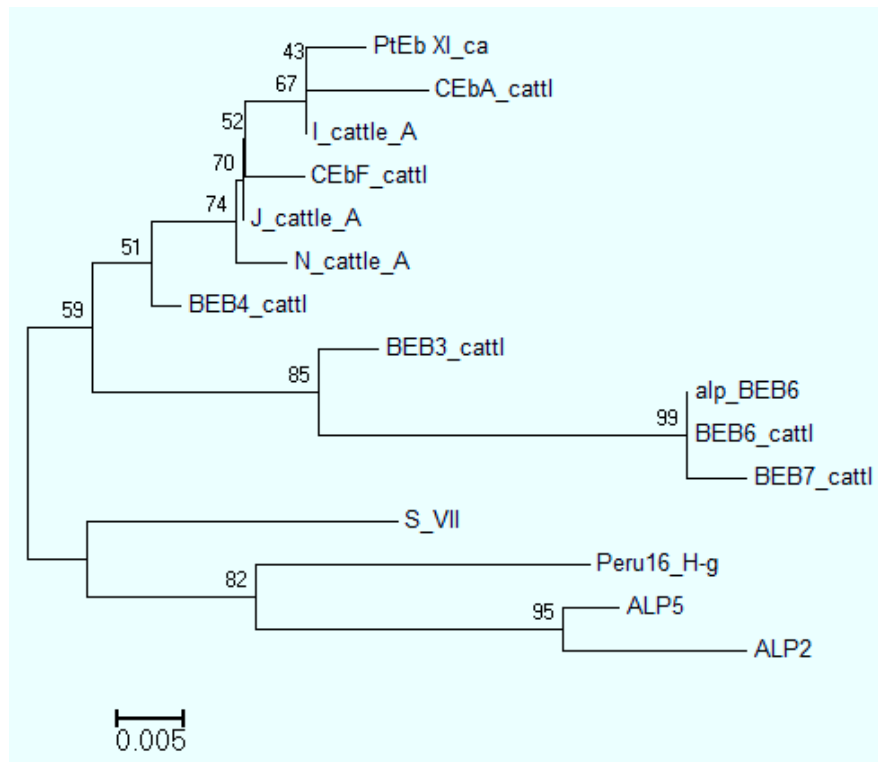
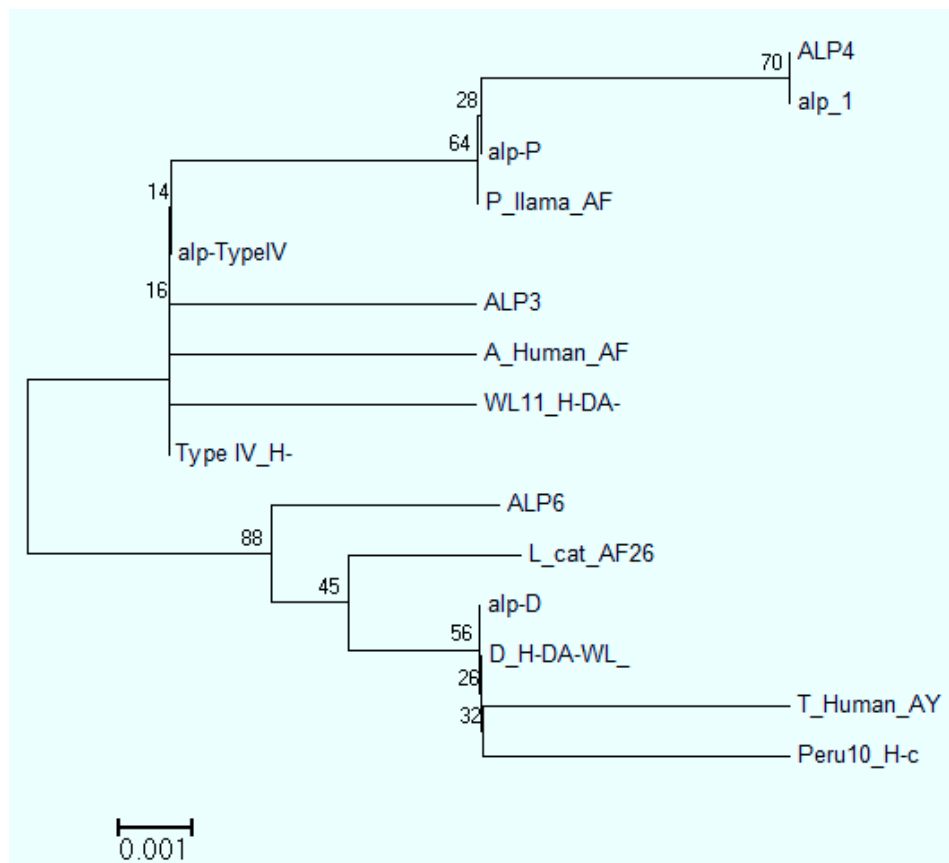


Figura 15. Asociación filogenética de genotipos de *Enterocytozoon bienewisi* identificados en crías de alpacas “**Grupo 2**” (Genotipos ALP1, ALP3, ALP4, ALP6, TypeIV, P y D) y otros genotipos inscritos en el GenBank (Santin y Fayer, 2011). Escala: sustituciones/sitio.



El estudio de las secuencias analizando el gen de la triosa fosfato isomerasa (TPI) para *Giardia* mostró la presencia de 2 ensamblajes: A y E. El ensamblaje A fue visto en 33 animales y el ensamblaje E fue visto en 9. La mayoría de las infecciones por el ensamblaje A fueron causadas por el sub-ensamblaje AI, excepto por dos, que fueron causados por el sub-ensamblaje AII (Figura 17, Anexo 4).

Las nueve crías que estaban infectadas con *G. duodenalis* ensamblaje E, fueron detectados solamente en crías provenientes del departamento de Cusco (88.9%) y Huancavelica (11.1%). *G. duodenalis* ensamblaje A fue detectado en los tres departamentos, con una tasa de infección de 2.7%, 36.7% y 37.9% en crías provenientes de Cuzco, Huancavelica y Puno, respectivamente.

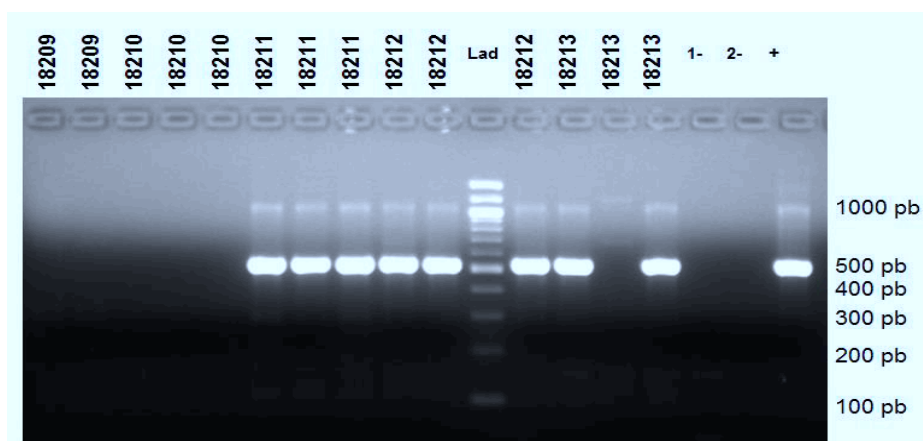
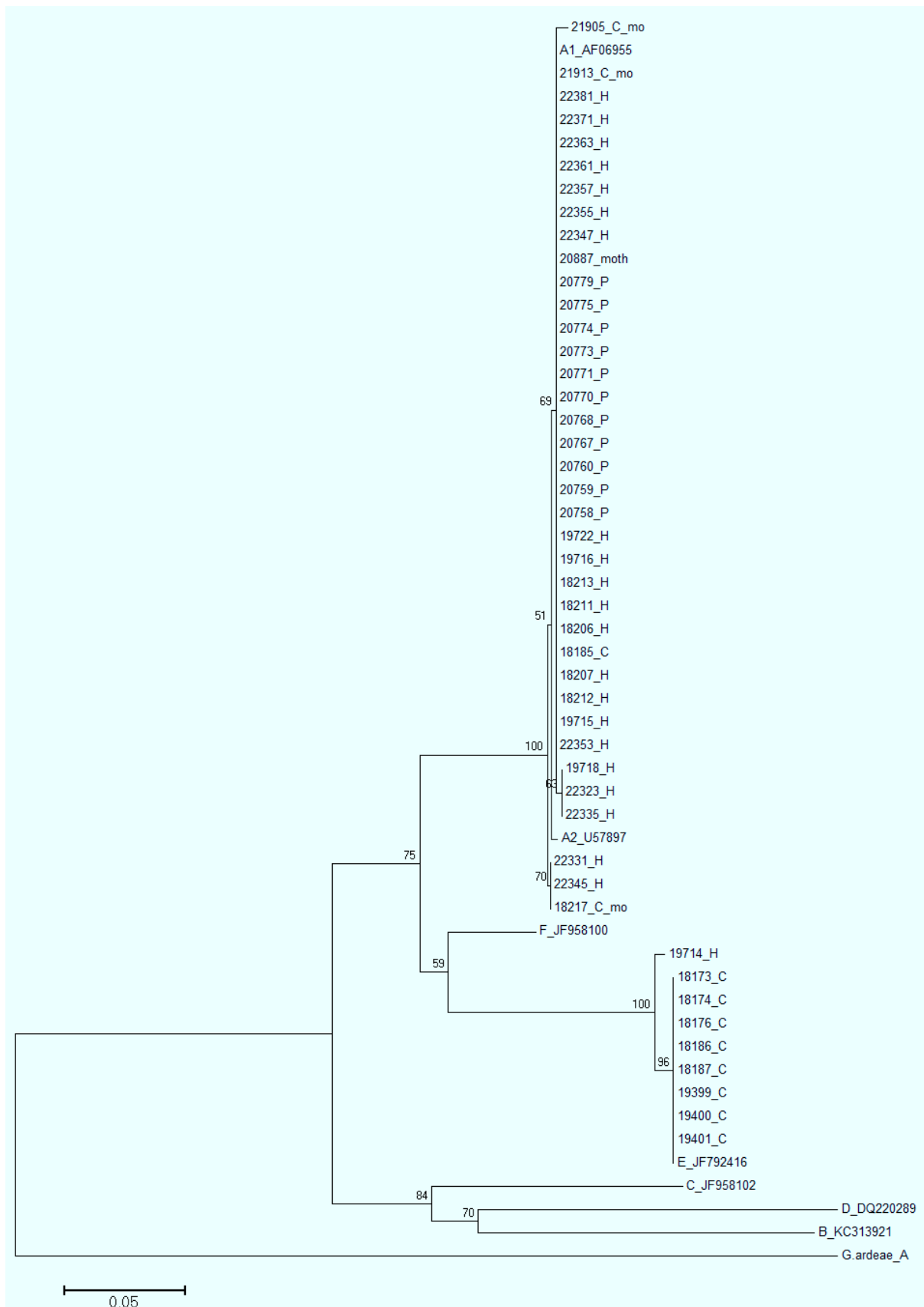


Figura 16. Diagnóstico específico de *Giardia duodenalis* median PCR anidado basados en el gen TPI. Muestras positivas con una banda de aproximadamente 530 pb.

Cuadro 5. Ocurrencia de genotipos de *Giardia duodenalis* en crías de alpacas de Perú

Departamento	No. de muestras	No de positivos	Porcentaje de infección	Ensamblaje		
				AI	AII	E
Cuzco	37	9	24.3	1	0	8
Huancavelica	60	22	36.7	19	2	1
Puno	29	11	37.9	11	0	0
Total	126	42	33.3	31	2	9

Figura 17. Asociación filogenética de ensamblajes de *Giardia duodenalis* identificados en crías de alpacas y otros genotipos inscritos en el GenBank. Escala: sustituciones/sitio.



V. DISCUSIÓN

Actualmente, los estudios moleculares realizados en muestras fecales de vertebrados, demuestran una diversidad respecto a los genotipos de *E. bienensi*. Esta diversidad de genotipos es observada en los hospedadores, existiendo especificidad de hospedador para algunos genotipos (Santin y Fayer, 2011). Sin embargo, a pesar de existir una diversidad amplia de genotipos de *E. bienensi*, hasta ahora no está bien esclarecido la dinámica de transmisión y el ciclo de vida de este parásito (Wasson y Peper, 2000). *E. bienensi* ha sido detectado en humanos y en una gran variedad de mamíferos domésticos y silvestres, incluyendo también a algunas especies de aves (Santin y Fayer, 2009a, 2011). El presente estudio demuestra por primera vez la presencia de *E. bienensi* en alpacas, y demuestra que ellas pueden ser infectadas por al menos 10 genotipos de *E. bienensi*, incluyendo a algunos genotipos con potencial zoonótico.

Diversos estudios realizados en animales domésticos demuestran que la microsporidiosis por *E. bienensi* tiene una tasa de infección que puede ir de 0,7 a 94% en cerdos, y de 3 a 100% en ganado vacuno (Leelayoova *et al.*, 2009; Abe y Kimata, 2010; Santin y Fayer, 2009b, 2011). Sin embargo, los estudios de *E. bienensi* en animales no lo asocian con la presencia de diarrea en ellos a diferencia de los reportes en humanos. Estudios realizados en niños, pacientes con el virus del SIDA y VIH, así como en pacientes inmunocomprometidos como los receptores de trasplante de órgano, han demostrado ser susceptibles a la infección por *E. bienensi*, provocando en ellos diarrea aguda, pudiendo prolongarse a diarrea crónica (Gumbo *et al.*, 1999). En nuestro estudio, *E. bienensi* se detectó en sesenta y cinco de 126 crías de alpacas, este resultado

indica una tasa de infección para las crías de 51,6%. Sin embargo, los análisis estadísticos realizados mostraron que *E. bieneusi* no se encuentra asociada con la presencia de diarrea en alpacas, al igual que algunos estudios realizados en bovinos y cerdos (Fayer *et al.*, 2007; Sak *et al.*, 2008). Sería necesario realizar un estudio caso-control para poder verificar si verdaderamente no existe asociación entre estas dos variables.

Estudios científicos sobre microsporidiosis, realizados en camélidos sudamericanos son escasos. Actualmente, existe un informe del microsporidio *Encephalitozoon cuniculi* asociado con placentitis y con la muerte perinatal en una alpaca de los Estados Unidos (Webster *et al.*, 2008). Así mismo, existe el reporte de una infección por *E. bieneusi* genotipo P en una llama adulta de un zoológico de Alemania (Dengjel *et al.*, 2001). En nuestro estudio, la caracterización molecular de las secuencias de la región ITS, dieron como resultado diez genotipos diferentes de *E. bieneusi* en las heces de crías. Cuatro de estos genotipos fueron similares a los registrados en el GenBank, estos son: los genotipos P, Tipo IV, D y BEB6; y los seis genotipos restantes fueron clasificados como nuevos.

El genotipo P, ha sido reportado únicamente en una llama adulta de un zoológico de Alemania (Dengjel *et al.*, 2001). En el presente estudio, cinco crías (4 de Cuzco y 1 de Huancavelica) fueron infectadas con el genotipo P, esto representa el 7,7% del total de los animales infectados. Este hallazgo demuestra que la alpaca es un nuevo hospedador natural para el genotipo P. Probablemente el genotipo P sea específico de camélidos sudamericanos.

Por otro lado, cuatro crías fueron infectadas con el genotipo Tipo IV y dos con el genotipo D. Este resultado es interesante, debido a que estos genotipos tienen potencial zoonótico. El genotipo Tipo IV fue hallado por vez primera en pacientes con microsporidiosis intestinal en Francia (Liguory *et al.*, 1998). Posteriormente fue hallado en pacientes con VIH/SIDA, niños y pacientes con trasplante de órgano en Camerún, Perú, Inglaterra, Uganda, Nigeria, Malaui y en los Países Bajos (Sadler *et al.*, 2002; Tumwine *et al.*, 2002; Breton *et al.*, 2007; Cama *et al.*, 2007; Espern *et al.*, 2007; ten Hove *et al.*, 2009). Sin embargo, un estudio realizado en animales por Dengjel *et al.*

(2001) registro por primera vez el genotipo Tipo IV en gatos domésticos de Alemania. Otros estudios realizados en animales reportaron al genotipo Tipo IV en gatos de Portugal, Japón y Colombia (Lobo *et al.*, 2006b; Santin *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2009). Al parecer el gato actúa como el reservorio ideal para el genotipo Tipo IV. Así mismo, se ha reportado al genotipo Tipo IV en bovinos de Portugal, USA y Corea, así como en perros de Colombia (Sulaiman *et al.*, 2004; Lee 2008; Santin *et al.*, 2008). En el presente estudio, cuatro crías (3 de Cuzco y 1 de Huancavelica) fueron infectadas con el genotipo Tipo IV. Probablemente el contagio de las alpacas se deba a que en las comunidades campesinas la carencia de letrinas es algo común y los humanos pueden servir como diseminadores de la enfermedad. Del mismo modo, las alpacas comparten el hábitat con bovinos y gatos domésticos o silvestres, ellos también pueden contaminar las zonas de pastoreo de las alpacas.

Dos crías de alpacas del departamento de Huancavelica estuvieron infectadas con *E. bienewsi* genotipo D. El genotipo D fue reportado por primera vez por Chalifoux *et al.* (2000) en un macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) del “New England Regional Primate Research Center” en USA. Desde entonces, el genotipo D ha sido descrito en una variedad de hospedadores como humanos inmunocomprometidos de Camerún, Perú, Inglaterra, Nigeria Vietnam, Tailandia, Malaui y los Países Bajos. Así mismo, ha sido descrito en cerdos de USA, Japón y la Republica Checa; bovinos de USA y Corea; halcones de Abu Dabi; caballos de Colombia y perros de Portugal. Otros estudios indican que algunos animales silvestres como castores, zorros, comadrejas y mapaches de USA también son parasitados por el genotipo D (Bern *et al.*, 2005; Cama *et al.*, 2007; Santin y Fayer, 2011).

Únicamente, una cría del departamento de Huancavelica estuvo parasitada por *E. bienewsi* genotipo BEB6, este genotipo únicamente ha sido descrito en bovinos de USA (Fayer *et al.*, 2007). Con el hallazgo de los genotipos Tipo IV, D y BEB6, se pudiera especular que existe una transmisión directa entre alpacas y bovinos, debido a que estos tres genotipos son muy frecuentes en bovinos de diversos países (Sulaiman *et al.*, 2004; Santin *et al.*, 2005; Fayer *et al.*, 2007).

El mayor número de crías (n=48), que representa el 73,8% del total de animales infectados, estaban parasitadas con un genotipo nuevo, el cual fue denominado ALP1. El genotipo ALP1 se encontró en crías de las tres localidades del Perú: Cuzco (5/25 genotipos), Puno (27/27 genotipos) y Huancavelica (16/26 genotipos), respectivamente (ver cuadro 3). Nuestros resultados indican que el genotipo ALP1 probablemente sea específico para las alpacas.

Seis genotipos de *E. bienewsi* fueron considerados nuevos en este trabajo, ALP1, ALP2, ALP3, ALP4, ALP5 y ALP6, esto debido a no tener ninguna identidad con los genotipos registrados en el GenBank. Filogenéticamente, los genotipos ALP2 y ALP5 se encuentran emparentados con el genotipo Peru16 (ver figura 13), un genotipo zoonótico que parasita humanos y cobayos (Cama *et al.*, 2007). Los genotipos ALP1 y ALP4 se relacionan con el genotipo P, que es propio de llamas. El genotipo ALP3 con el genotipo Type IV, el cual parasita humanos, bovinos, gato y perro. Por último, el genotipo ALP6 está emparentado con el genotipo L, un genotipo propio de gatos.

Respecto a *G. duodenalis*, de las 126 muestras fecales analizadas, 42 muestras fueron positivas a *G. duodenalis* mediante la técnica de PCR, representando una porcentaje de infección de 33.3%. La prevalencia de infección siempre va a variar en el primer mes de edad de los animales, principalmente en el ganado (Santin *et al.*, 2009). Esta variación se debe principalmente a la zona geográfica y a los cambios climáticos. Establos cerca de ríos y zonas pantanosas, así como en épocas de mayor precipitación fluvial va haber una mayor prevalencia de giardiasis (Thompson y Monis, 2004; Plutzer *et al.*, 2010). Así se tiene estudios realizados en terneros de diversos estados de USA indican una prevalencia que varía del 10 al 85% (Santin *et al.*, 2009). Gómez-Couso *et al.*, (2012) indica una prevalencia de 50% en alpacas de un mes de edad.

Giardia es mundialmente reconocido como un patógeno importante causante de diarrea en los animales y seres humanos. Sin embargo, a pesar de la moderada prevalencia en el ganado y mascotas domésticas como el perro y el gato, su importancia como patógeno en los animales aún no está esclarecido (Geurden *et al.*, 2010). *Giardia duodenalis* es un parásito frecuentemente en vacunos, pero aparentemente no se encuentra asociación con la presencia de diarrea (O'Handley y Olson, 2006). Los

resultados de nuestro estudio demostraron que no existe asociación entre la infección por *Giardia* con la presencia de diarrea neonatal en alpacas. Sin embargo, diversos estudios realizados en llamas y alpacas mencionan que existe una asociación entre *Giardia* con mortalidad de crías a causa de diarrea (Kiorpes *et al.*, 1987; Cebra *et al.*, 2003).

Actualmente, *Giardia duodenalis* se encuentra sub-clasificada en 7 ensamblajes (genotipos): A, B, C, D, E, F y G. La sub-clasificación es debido a los análisis moleculares realizados principalmente en los genes triosa fosfato isomerasa (TPI), Glutamato deshidrogenasa (GDH) y β -giardin (Monis *et al.*, 1996; Caccio *et al.*, 2002; Sulaiman *et al.*, 2003). De estos 7 ensamblajes únicamente los ensamblajes A, B y E están relacionados con el ganado vacuno, ovino y porcino. Sprong *et al.* (2009) realiza una recopilación de información sobre *Giardia* y menciona que el ensamblaje de mayor presentación en el ganado es el “E” (72 al 82%), seguido del “A” (17 al 23%) y el “B” (1 a 2 %), respectivamente.

Estudios epidemiológicos moleculares han demostrado la ocurrencia común de *G. duodenalis* ensamblaje A en seres humanos y en un grado menor en los animales domésticos y silvestres (Feng y Xiao, 2011). En la actualidad, el ensamblaje A tiene tres sub-conjuntos: AI, AII y AIII (Caccio y Sprong, 2010; Feng y Xiao, 2011). Diversos estudios han demostrado que el sub-ensamblaje AII puede encontrarse en vacunos. Sin embargo, el sub-ensamblaje AI es el más frecuente en estos animales, así como en animales silvestre, por lo que se le considera un subtipo con importancia zoonótica (Xiao y Fayer, 2008; Caccio y Sprong de 2010).

Estudios realizados en camélidos sudamericanos son escasos, y la mayoría de ellos solo se basa en diagnóstico microscópico y no molecular. En 1987, Kiorpes *et al.*, aisló *Giardia* sp. de llamas de un establo de Wisconsin, U.S.A, en su estudio utilizó los quistes provenientes de las llamas infectadas para infectar experimentalmente a jerbos mongoles. El resultado del estudio de Kiorpes *et al.*, demostró que los quistes fueron infecciosos para jerbos mongoles, lo que lo llevó a sugerir que la *Giardia* de la llama era un genotipo con potencial zoonótico (Kiorpes *et al.*, 1987). Posteriormente, estudios moleculares realizados en muestras fecales de alpacas han demostrado que ellos pueden

ser parasitados con *G. duodenalis* ensamblajes A y E (Trucha *et al.*, 2008; Gómez-Couso *et al.*, 2012). En el presente estudio, el ensamblaje A fue detectado en 33 de 126 animales (33%). De estas 33 muestras correspondientes al ensamblaje A, 31 eran AI y estaban presentes en alpacas de los tres departamentos: 19 crías de Huancavelica, 11 de Puno y 1 de Cuzco. Únicamente dos muestras del ensamblaje A correspondían a AII y se les halló solo en crías de Huancavelica. *G. duodenalis* ensamblaje E es el genotipo más común en el ganado y es más frecuente en terneros de 4 a 8 semanas de edad (Santin *et al.*, 2009; Uehlinger *et al.*, 2011). Estudios realizados en terneros de USA de un mes de edad indican que la prevalencia del ensamblaje E puede llegar hasta un 70% (Santin *et al.*, 2009). En el presente estudio, el porcentaje de infección por el ensamblaje E fue del 2,6% y fue hallado en 9 crías, 8 del Cuzco y 1 de Huancavelica a diferencia del 26% detectado por Gomez-Couso (2012). Tal vez esta diferencia se puede deber al mayor número de hatos muestreados en su estudio.

Los estudios realizados en distintos países muestran que el ganado se infectan comúnmente por los ensamblajes A y E (Trucha *et al.*, 2007; Geurden *et al.*, 2008; Sprong *et al.*, 2009; Sweeny *et al.*, 2011). El similar hallazgo en nuestro estudio, al detectar los ensamblajes A y E, es causado probablemente por el tipo de manejo de las alpacas en el Perú. Las alpacas que participaron en este estudio, se encontraban próximos a zonas ganaderas de bovinos y ovinos. Con frecuencia, las alpacas se alimentan de pasturas compartidas con el ganado, o que también han sido utilizadas por el ganado bovino y ovino. Por lo tanto, podría haber un potencial de transmisión cruzada de giardiasis entre especies de estos animales. Por otro lado, el hecho que Huancavelica y Puno tenga un mayor porcentaje de infección por el ensamblaje A, indicaría que el humano está involucrado en la dinámica de transmisión de la giardiasis en los dos departamentos. Aun quedaría por determinarse la posible transmisión de *G. duodenalis* ensamblaje A entre alpacas y pastores.

VI. CONCLUSIONES

- Las crías de alpacas son hospedadores naturales para los parásitos gastrointestinales *Enterocytozoon bieneusi* y *Giardia duodenalis*.
- El mayor número de genotipos de *E. bieneusi* hallados en alpacas corresponden al nuevo genotipo ALP1.
- Las crías de alpacas también pueden ser parasitadas por genotipos zoonóticos de *E. bieneusi*.
- Los ensamblajes (genotipos) de *G. duodenalis* que tuvieron mayor porcentaje de infección correspondieron al ensamblaje A, un ensamblaje zoonótico.
- El segundo ensamblaje de *G. duodenalis* correspondió al ensamblaje E, que es propio de ganado.

VII. LITERATURA CITADA

Abe N, Kimata I, Iseki M. 2003. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* isolates from dogs in Japan by direct sequencing of the PCR amplified glutamate dehydrogenase gene. J Vet Med Sci 65: 29-33.

Abe N, Kimata I, Iseki M. 2009. Molecular evidence of *Enterocytozoon bieneusi* in Japan. Journal of Veterinary Medical Science 71: 217–219.

Abe N, Kimata I. 2010. Molecular survey of *Enterocytozoon bieneusi* in a Japanese porcine population. Vector Borne Zoonotic Dis 10: 425-427.

Accoceberry I, Thellier M, Desportes-Livage I, Achbarou A, Biligui S, Danis M, Datry A. 1999. Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bieneusi*. J Clin Microbiol 37: 4107-4112.

Achbarou A, Ombrouck C, Gneragbe T, Charlotte F, Renia L, Desportes-Livage I, Mazier D. 1996. Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. Parasite Immunol 18: 387-392.

Ash A, Lymbery A, Lemon J, Vitali S, Thompson RC. 2010. Molecular epidemiology of *Giardia duodenalis* in an endangered carnivore--the African painted dog. Vet Parasitol 174: 206-212.

Avery SW, Undeen AH. 1987. The isolation of microsporidia and other pathogens from concentrated ditch water. *J Am Mosq Control Assoc* 3: 54-58.

Ballweber LR, Xiao L, Bowman DD, Kahn G, Cama VA. 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. *Trends Parasitol* 26: 180-189.

Bern C, Kawai V, Vargas D, Rabke-Verani J, Williamson J, Chavez-Valdez R, Xiao L, Sulaiman I, Vivar A, Ticona E, Navincopa M, Cama V, Moura H, Secor WE, Visvesvara G, Gilman RH. 2005. The epidemiology of intestinal microsporidiosis in patients with HIV/AIDS in Lima, Peru. *J Infect Dis* 191, 1658–1664.

Bigliardi E, Sacchi L. 2001. Cell biology and invasion of the microsporidia. *Microbes Infect* 3: 373-379.

Blanshard C, Ellis DS, Tovey DG, Dowell S, Gazzard BG. 1992. Treatment of intestinal microsporidiosis with albendazole in patients with AIDS. *AIDS* 6: 311-313.

Breitenmoser AC, Mathis A, Burgi E, Weber R, Deplazes P. 1999. High prevalence of *Enterocytozoon bienersi* in swine with four genotypes that differ from those identified in humans. *Parasitology* 118 (Pt 5): 447-453.

Breton J, Bart-Delabesse E, Biligui S, Carbone A, Seiller X, Okome-Nkoumou M, Nzamba C, Kombila M, Accoceberry I, Thellier M. 2007. New highly divergent rRNA sequence among biodiverse genotypes of *Enterocytozoon bienersi* strains isolated from humans in Gabon and Cameroon. *J Clin Microbiol* 45: 2580-2589.

Bryan RT, Schwartz DA. 1999. Epidemiology of microsporidiosis. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 502–516.

Buckholt MA, Lee JH, Tzipori S. 2002. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in swine: an 18-month survey at a slaughterhouse in Massachusetts. *Appl Environ Microbiol* 68: 2595-2599.

Buret AG. 2007. Mechanisms of epithelial dysfunction in giardiasis. *Gut* 56: 316-317.

Caccio SM, Beck R, Lalle M, Marinculic A, Pozio E. 2008. Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* reveals striking differences between assemblages A and B. *Int J Parasitol* 38: 1523-1531.

Caccio SM, Sprong H. 2010. *Giardia duodenalis*: genetic recombination and its implications for taxonomy and molecular epidemiology. *Exp Parasitol* 124: 107-112.

Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. 2005. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends Parasitol* 21: 430-437.

Cali A, Owen RL. 1990. Intracellular development of *Enterocytozoon*, a unique microsporidian found in the intestine of AIDS patients. *J Protozool* 37: 145-155.

Cali A, Takvorian P. 1999. Developmental morphology and life cycles of the microsporidia. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 85–128.

Cama VA, Pearson J, Cabrera L, Pacheco L, Gilman R, Meyer S, Ortega Y, Xiao L. 2007. Transmission of *Enterocytozoon bieneusi* between a child and guinea pigs. *J Clin Microbiol* 45: 2708-2710.

Cavalier-Smith T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biol Rev Camb Philos Soc* 73: 203-266.

Cavalier-Smith T, Chao EE. 2003. Phylogeny and classification of phylum Cercozoa (Protozoa). Protist 154: 341-358.

CDC. 2013. Centers for Disease Control and Prevention. (Internet), (Marzo, 2013). Disponible en: <http://www.cdc.gov/>

Chalifoux LV, MacKey J, Carville A, Shvetz D, Lin KC, Lackner A, Mansfield KG. 1998. Ultrastructural morphology of *Enterocytozoon bieneusi* in biliary epithelium of rhesus macaques (*Macaca mulatta*). Vet Pathol 35: 292-296.

Chalifoux LV, Carville A, Pauley D, Thompson B, Lackner AA, Mansfield KG. 2000. *Enterocytozoon bieneusi* as a cause of proliferative serositis in simian immunodeficiency virus-infected immunodeficient macaques (*Macaca mulatta*). Arch Pathol Lab Med 124: 1480-1484.

Chase CC, Hurley DJ, Reber AJ. 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. Vet Clin North Am Food Anim Pract 24: 87-104.

Clark JT, Holberton DV. 1988. Triton-labile antigens in flagella isolated from *Giardia lamblia*. Parasitol Res 74: 415-423.

Cotte L, Rabodonirina M, Chapuis F, Bailly F, Bissuel F, Raynal C, Gelas P, Persat F, Piens MA, Trepo C. 1999. Waterborne outbreak of intestinal microsporidiosis in persons with and without human immunodeficiency virus infection. J Infect Dis 180: 2003-2008.

Cox FE. 2002. Systematics of the parasitic Protozoa. Trends Parasitol 18: 108.

Chase CC, Hurley DJ, Reber AJ. 2008. Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response. Vet Clin North Am Food Anim Pract 24: 87-104.

Coyle C, Kent M, Tanowitz HB, Wittner M, Weiss LM. 1998. TNP-470 is an effective antimicrosporidial agent. *J Infect Dis* 177: 515-518.

Dascomb K, Clark R, Aberg J, Pulvirenti J, Hewitt RG, Kissinger P, Didier ES. 1999. Natural history of intestinal microsporidiosis among patients infected with human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 37: 3421-3422.

Dascomb K, Frazer T, Clark RA, Kissinger P, Didier E. 2000. Microsporidiosis and HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr* 24: 290-292.

Daugeschies A, Agneessens J, Goossens L, Mengel H, Veys P. 2007. The effect of a metaphylactic treatment with diclazuril (Vecoxan) on the oocyst excretion and growth performance of calves exposed to a natural *Eimeria* infection. *Vet Parasitol* 149: 199-206.

David L, Weiser J. 1993. Role of hemocytes in the propagation of a microsporidian infection in Larvae of *Galleria mellonella*. *J Invertebr Pathol* 63: 212-213.

del Aguila C, Rueda C, De la Camara C, Fenoy S. 2001. Seroprevalence of anti-*Encephalitozoon* antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *J Eukaryot Microbiol Suppl*: 75S-78S.

Dengjel B, Zahler M, Hermanns W, Heinritzi K, Spillmann T, Thomschke A, Loscher T, Gothe R, Rinder H. 2001. Zoonotic potential of *Enterocytozoon bienersi*. *J Clin Microbiol* 39: 4495-4499.

Deplazes P, Mathis A, Muller C, Weber R. 1996. Molecular epidemiology of *Encephalitozoon cuniculi* and first detection of *Enterocytozoon bienersi* in faecal samples of pigs. *J Eukaryot Microbiol* 43: 93S.

Deplazes P, Mathis A, Weber R. 2000. Epidemiology and zoonotic aspects of microsporidia of mammals and birds. *Contrib Microbiol* 6: 236-260.

Desportes I, Le Charpentier Y, Galian A, Bernard F, Cochand-Priollet B, Lavergne A, Ravisse P, Modigliani R. 1985. Occurrence of a new microsporidan: *Enterocytozoon bienersi* n.g., n. sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J Protozool* 32: 250-254.

Didier ES. 1995. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol* 17: 405-412.

Didier ES. 1997. Effects of albendazole, fumagillin, and TNP-470 on microsporidian replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 1541-1546.

Didier ES. 2005. Microsporidiosis: an emerging and opportunistic infection in humans and animals. *Acta Trop* 94: 61-76.

Didier ES, Bessinger GT. 1999. Host-parasite relationships in microsporidiosis: animal models and immunology. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC.

Didier ES, Didier PJ, Snowden KF, Shadduck JA. 2000. Microsporidiosis in mammals. *Microbes Infect* 2: 709-720.

Didier ES, Maddry JA, Brindley PJ, Stovall ME, Didier PJ. 2005. Therapeutic strategies for human microsporidia infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 3: 419-434.

Didier ES, Orenstein JM, Aldras A, Bertucci D, Rogers LB, Janney FA. 1995. Comparison of three staining methods for detecting microsporidia in fluids. *J Clin Microbiol* 33: 3138-3145.

Didier ES, Snowden KF, Shadduck JA. 1998. Biology of microsporidian species infecting mammals. *Adv Parasitol* 40: 283-320.

Didier ES, Stovall ME, Green LC, Brindley PJ, Sestak K, Didier PJ. 2004. Epidemiology of microsporidiosis: sources and modes of transmission. *Vet Parasitol* 126: 145-166.

Didier PJ, Phillips JN, Kuebler DJ, Nasr M, Brindley PJ, Stovall ME, Bowers LC, Didier ES. 2006. Antimicrosporidial activities of fumagillin, TNP-470, ovalicin, and ovalicin derivatives in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 2146-2155.

Dieterich DT, Lew EA, Kotler DP, Poles MA, Orenstein JM. 1994. Treatment with albendazole for intestinal disease due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with AIDS. *J Infect Dis* 169: 178-183.

Dissanaike AS, Canning EU. 1957. The mode of emergence of the sporoplasm in microsporidia and its relation to the structure of the spore. *Parasitology* 47: 92-99.

Donham KJ. 2000. The concentration of swine production. Effects on swine health, productivity, human health, and the environment. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 16: 559-597.

Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL. 1998. Confirmation of the human-pathogenic microsporidia *Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, and *Vittaforma corneae* in water. *Appl Environ Microbiol* 64: 3332-3335.

Edlind TD, Li J, Visvesvara GS, Vodkin MH, McLaughlin GL, Katiyar SK. 1996. Phylogenetic analysis of beta-tubulin sequences from amitochondrial protozoa. *Mol Phylogenet Evol* 5: 359-367.

Embley TM, Hirt RP. 1998. Early branching eukaryotes? *Curr Opin Genet Dev* 8: 624-629.

Enriquez FJ, Wagner G, Fragoso M, Ditrich O. 1998. Effects of an anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial development in vitro. *Parasitology* 117 (Pt 6): 515-520.

Esporn A, Morio F, Miegerville M, Illa H, Abdoulaye M, Meyssonier V, Adehossi E, Lejeune A, Cam PD, Besse B, Gay-Andrieu F. 2007. Molecular study of Microsporidiosis due to *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* among human immunodeficiency virus-infected patients from two geographical areas: Niamey, Niger, and Hanoi, Vietnam. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2999–3002.

Fayer R, Santin M, Trout JM. 2007. *Enterocytozoon bienersi* in mature dairy cattle on farms in the eastern United States. *Parasitol Res* 102: 15-20.

Feng Y, Xiao L. 2011. Zoonotic potential and molecular epidemiology of *Giardia* species and giardiasis. *Clin Microbiol Rev* 24: 110-140.

Foronda P, Bargues MD, Abreu-Acosta N, Periago MV, Valero MA, Valladares B, Mas-Coma S. 2008. Identification of genotypes of *Giardia intestinalis* of human isolates in Egypt. *Parasitol Res* 103: 1177-1181.

Foucault C, Drancourt M. 2000. Actin mediates *Encephalitozoon intestinalis* entry into the human enterocyte-like cell line, Caco-2. *Microb Pathog* 28: 51-58.

Fournier S, Dubrou S, Liguory O, Gaussin F, Santillana-Hayat M, Sarfati C, Molina JM, Derouin F. 2002. Detection of Microsporidia, cryptosporidia and *Giardia* in swimming pools: a one-year prospective study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 33: 209-213.

Fournier S, Liguory O, Santillana-Hayat M, Guillot E, Sarfati C, Dumoutier N, Molina J, Derouin F. 2000. Detection of microsporidia in surface water: a one-year follow-up study. *FEMS Immunol Med Microbiol* 29: 95-100.

Franzen C. 2004. Microsporidia: how can they invade other cells? Trends Parasitol 20: 275-279.

Franzen C. 2005. How do microsporidia invade cells?. Folia Parasitol (Praha) 52: 36-40.

Franzen C. 2008. Microsporidia: A Review of 150 Years of Research. The Open Parasitology Journal 2: 1-34.

Franzen C, Muller A. 1999. Cryptosporidia and microsporidia--waterborne diseases in the immunocompromised host. Diagn Microbiol Infect Dis 34: 245-262.

Franzen C, Muller A, Hartmann P, Salzberger B. 2005. Cell invasion and intracellular fate of *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidia). Parasitology 130: 285-292.

Friedberg DN, Ritterband DC. 1999. Ocular microsporidiosis, In: Wittner M, Weiss L. (Ed.) The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 293–314.

Fuentealba IC, Mahoney NT, Shaddock JA, Harvill J, Wicher V, Wicher K. 1992. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. Vet Pathol 29: 536-540.

Gardiner CH, Fayer R, Dubey JP. 1998. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues, second Edition. American Registry of Pathology, Washington, DC.

Gaydos JK, Miller WA, Johnson C, Zornetzer H, Melli A, Packham A, Jeffries SJ, Lance MM, Conrad PA. 2008. Novel and canine genotypes of *Giardia duodenalis* in harbor seals (*Phoca vitulina richardsi*). J Parasitol 94: 1264-1268.

Gelanew T, Lalle M, Hailu A, Pozio E, Caccio SM. 2007. Molecular characterization of human isolates of *Giardia duodenalis* from Ethiopia. Acta Trop 102: 92-99.

Germot A, Philippe H. 1999. Critical analysis of eukaryotic phylogeny: a case study based on the HSP70 family. *J Eukaryot Microbiol* 46: 116-124.

Germot A, Philippe H, Le Guyader H. 1997. Evidence for loss of mitochondria in Microsporidia from a mitochondrial-type HSP70 in *Nosema locustae*. *Mol Biochem Parasitol* 87: 159-168.

Geurden T, Berkvens D, Casaert S, Vercruysse J, Claerebout E. 2008. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Parasitol* 157: 14-20.

Geurden T, Claerebout E, Vercruysse J, Berkvens D. 2004. Estimation of diagnostic test characteristics and prevalence of *Giardia duodenalis* in dairy calves in Belgium using a Bayesian approach. *Int J Parasitol* 34: 1121-1127.

Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E. 2006. Field testing of a fenbendazole treatment combined with hygienic and management measures against a natural *Giardia* infection in calves. *Vet Parasitol* 142: 367-371.

Geurden T, Vercruysse J, Claerebout E. 2010. Is *Giardia* a significant pathogen in production animals? *Exp Parasitol* 124: 98-106.

Ghosh K, Weiss LM. 2009. Molecular diagnostic tests for microsporidia. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2009: 926521.

Godden S. 2008. Colostrum management for dairy calves. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 24: 19-39.

Gómez-Couso H, Ortega-Mora LM, Aguado-Martínez A, Rosadio-Alcántara R, Maturrano-Hernández L, Luna-Espinoza L, Zanabria-Huisa V, Pedraza-Díaz S. 2012. Presence and molecular characterisation of *Giardia* and *Cryptosporidium* in alpacas (*Vicugna pacos*) from Peru. *Vet Parasitol* 187: 414-420.

Graczyk TK, Sunderland D, Rule AM, da Silva AJ, Moura IN, Tamang L, Girouard AS, Schwab KJ, Breyse PN. 2007. Urban feral pigeons (*Columba livia*) as a source for air- and waterborne contamination with *Enterocytozoon bieneusi* spores. *Appl Environ Microbiol* 73: 4357-4358.

Green LC, Didier PJ, Bowers LC, Didier ES. 2004. Natural and experimental infection of immunocompromised rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with the microsporidian *Enterocytozoon bieneusi* genotype D. *Microbes Infect* 6: 996-1002.

Grinberg A, Markovics A, Galindez J, Lopez-Villalobos N, Kosak A, Tranquillo VM. 2002. Controlling the onset of natural cryptosporidiosis in calves with paromomycin sulphate. *Vet Rec* 151: 606-608.

Gumbo T, Sarbah S, Gangaidzo IT, Ortega Y, Sterling CR, Carville A, Tzipori S, Wiest PM. 1999. Intestinal parasites in patients with diarrhea and human immunodeficiency virus infection in Zimbabwe. *AIDS* 13: 819-821.

Hamnes IS, Gjerde BK, Forberg T, Robertson LJ. 2007. Occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in suckling piglets in Norway. *Vet Parasitol* 144: 222-233.

Hollister WS, Canning EU. 1987. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* and its use in determination of infections in man. *Parasitology* 94 (Pt 2): 209-219.

Hollister WS, Canning EU, Willcox A. 1991. Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. *Parasitology* 102 Pt 1: 33-43.

Homan WL, Mank TG. 2001. Human giardiasis: genotype linked differences in clinical symptomatology. *Int J Parasitol* 31: 822-826.

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RC. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *J Parasitol* 83: 44-51.

Hu J, McDougald LR. 2004. The efficacy of some drugs with known antiprotozoal activity against *Histomonas meleagridis* in chickens. *Vet Parasitol* 121: 233-238.

Isaac-Renton JL, Cordeiro C, Sarafis K, Shahriari H. 1993. Characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *J Infect Dis* 167: 431-440.

Jiang J, Alderisio KA, Singh A, Xiao L. 2005. Development of procedures for direct extraction of *Cryptosporidium* DNA from water concentrates and for relief of PCR inhibitors. *Appl Environ Microbiol* 71: 1135-1141.

Joseph J, Vemuganti GK, Garg P, Sharma S. 2006. Histopathological evaluation of ocular microsporidiosis by different stains. *BMC Clin Pathol* 6: 6.

Keohane EM, Weiss LM. 1999. The structure, function, and composition of the microsporidian polar tube. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 196-224.

Khan IA, Moretto M. 1999. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 67: 1887-1893.

Khan IA, Schwartzman JD, Kasper LH, Moretto M. 1999. CD8⁺ CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 162: 6086-6091.

Kiorpes AL, Kirkpatrick CE, Bowman DD. 1987. Isolation of *Giardia* from a llama and from sheep. *Can J Vet Res* 51: 277-280.

Kotler D, Orenstein JM. 1999. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) The Microsporidia and Microsporidiosis. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 258–292.

Kotler DP, Orenstein JM. 1998. Clinical syndromes associated with microsporidiosis. Adv Parasitol 40: 321-349.

Koudela B, Visvesvara GS, Moura H, Vavra J. 2001. The human isolate of *Brachiola algerae* (Phylum Microspora): development in SCID mice and description of its fine structure features. Parasitology 123: 153-162.

Koudela B, Vitovec J, Kucerova Z, Ditrich O, Travnicek J. 1993. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. Folia Parasitol (Praha) 40: 279-286.

Kramer JP. 1960. Observations on the emergence of the microsporidian sporoplasm. J Insect Pathol 2: 433-439.

Kucerova-Pospisilova Z, Ditrich O. 1998. The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. Folia Parasitol (Praha) 45: 108-112.

Kudo RR, Daniels EW. 1963. An electron microscope study of the spore of a microsporidian, *Thelohania californica*. J Protozool 10: 112-120.

Lane S, Lloyd D. 2002. Current trends in research into the waterborne parasite *Giardia*. Crit Rev Microbiol 28: 123-147.

Langkjaer RB, Vigre H, Enemark HL, Maddox-Hyttel C. 2007. Molecular and phylogenetic characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* from pigs and cattle in Denmark. Parasitology 134: 339-350.

Lasek-Nesselquist E, Welch DM, Sogin ML. 2010. The identification of a new *Giardia duodenalis* assemblage in marine vertebrates and a preliminary analysis of *G. duodenalis* population biology in marine systems. *Int J Parasitol* 40: 1063-1074.

Lebbad M, Mattsson JG, Christensson B, Ljungstrom B, Backhans A, Andersson JO, Svard SG. 2010. From mouse to moose: multilocus genotyping of *Giardia* isolates from various animal species. *Vet Parasitol* 168: 231-239.

Leelayoova S, Piyaraj P, Subrungruang I, Pagornrat W, Naaglor T, Phumklan S, Taamasri P, Suwanasri J, Mungthin M. 2009. Genotypic characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in specimens from pigs and humans in a pig farm community in Central Thailand. *J Clin Microbiol* 47: 1572-1574.

Lobo ML, Xiao L, Cama V, Magalhaes N, Antunes F, Matos O. 2006a. Identification of potentially human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in various birds. *Appl Environ Microbiol* 72: 7380-7382.

Lobo ML, Xiao L, Cama V, Stevens T, Antunes F, Matos O. 2006b. Genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in mammals in Portugal. *J Eukaryot Microbiol* 53 Suppl 1: S61-64.

Lee JH. 2008. Molecular detection of *Enterocytozoon bieneusi* and identification of a potentially human-pathogenic genotype in milk. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 1664–1666.

Liguory O, David F, Sarfati C, Derouin F, Molina JM. 1998. Determination of types of *Enterocytozoon bieneusi* strains isolated from patients with intestinal microsporidiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 36: 1882–1885.

Lom J, Vávra J. 1963. The mode of sporoplasm extrusion in microsporidian spores. *Acta Protozool* 1: 81-89.

Lowman PM, Takvorian PM, Cali A. 2000. The effects of elevated temperatures and various time-temperature combinations on the development of *Brachiola* (*Nosema*) *algerae* N. Comb. in mammalian cell culture. *J Eukaryot Microbiol* 47: 221-234.

Magaud A, Achbarou A, Desportes-Livage I. 1997. Cell invasion by the microsporidium *Encephalitozoon intestinalis*. *J Eukaryot Microbiol* 44: 81S.

Mansfield KG, Carville A, Hebert D, Chalifoux L, Shvetz D, Lin KC, Tzipori S, Lackner AA. 1998. Localization of persistent *Enterocytozoon bieneusi* infection in normal rhesus macaques (*Macaca mulatta*) to the hepatobiliary tree. *J Clin Microbiol* 36: 2336-2338.

Mathis A, Weber R, Deplazes P. 2005. Zoonotic potential of the microsporidia. *Clin Microbiol Rev* 18: 423-445.

Matsubayashi H, Koike T, Mikata I, Takei H, Hagiwara S. 1959. A case of *Encephalitozoon*-like body infection in man. *AMA Arch Pathol* 67: 181-187.

McGlade TR, Robertson ID, Elliot AD, Thompson RC. 2003. High prevalence of *Giardia* detected in cats by PCR. *Vet Parasitol* 110: 197-205.

Molina JM, Goguel J, Sarfati C, Chastang C, Desportes-Livage I, Michiels JF, Maslo C, Katlama C, Cotte L, Leport C, Raffi F, Derouin F, Modai J. 1997. Potential efficacy of fumagillin in intestinal microsporidiosis due to *Enterocytozoon bieneusi* in patients with HIV infection: results of a drug screening study. The French Microsporidiosis Study Group. *AIDS* 11: 1603-1610.

Monis PT, Caccio SM, Thompson RC. 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. *Trends Parasitol* 25: 93-100.

Monis PT, Thompson RC. 2003. *Cryptosporidium* and *Giardia*-zoonoses: fact or fiction? *Infect Genet Evol* 3, 233-244.

Morgenthaler O. 1922. Der Polfaden von *Nosema apis* Zander. Arch Bienenkunde 4: 53-60.

Moro D, Lawson MA, Hobbs RP, Thompson RC. 2003. Pathogens of house mice on arid Boullanger Island and subantarctic Macquarie Island, Australia. J Wildl Dis 39: 762-771.

Morrison HG, McArthur AG, Gillin FD, Aley SB, Adam RD, Olsen GJ, Best AA, Cande WZ, Chen F, Cipriano MJ, Davids BJ, Dawson SC, Elmendorf HG, Hehl AB, Holder ME, Huse SM, Kim UU, Lasek-Nesselquist E, Manning G, Nigam A, Nixon JE, Palm D, Passamaneck NE, Prabhu A, Reich CI, Reiner DS, Samuelson J, Svard SG, Sogin ML. 2007. Genomic minimalism in the early diverging intestinal parasite *Giardia lamblia*. Science 317: 1921-1926.

Mota P, Rauch CA, Edberg SC. 2000. Microsporidia and Cyclospora: epidemiology and assessment of risk from the environment. Crit Rev Microbiol 26: 69-90.

Moura H, da Silva AJ, Moura IN, Schwartz DA, Leitch G, Wallace S, Pieniazek NJ, Wirtz RA, Visvesvara GS. 1999. Characterization of *Nosema algerae* isolates after continuous cultivation in mammalian cells at 37 degrees C. J Eukaryot Microbiol 46: 14S-16S.

Moura H, Schwartz DA, Bornay-Llinares F, Sodre FC, Wallace S, Visvesvara GS. 1997. A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope" technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. Arch Pathol Lab Med 121: 888-893.

O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME. 1999. Duration of naturally acquired giardiasis and cryptosporidiosis in dairy calves and their association with diarrhea. J Am Vet Med Assoc 214: 391-396.

O'Handley RM, Olson ME. 2006. Giardiasis and cryptosporidiosis in ruminants. Vet Clin North Am Food Anim Pract 22: 623-643.

Ohshima K. 1937. On the function of the polar filament of *Nosema bombycis*. *Parasitology* 29: 220-224.

Olson ME, Ceri H, Morck DW. 2000. Giardia vaccination. *Parasitol Today* 16: 213-217.

Olson ME, McAllister TA, Deselliers L, Morck DW, Cheng KJ, Buret AG, Ceri H. 1995. Effects of giardiasis on production in a domestic ruminant (lamb) model. *Am J Vet Res* 56: 1470-1474.

Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RC. 2004. Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends Parasitol* 20: 185-191.

OMS. 1979. Parasitic Zoonoses. Report of a WHO Expert Committee with the participation of FAO. Technical Report Series 637.

Orlandi PA, Chu DT, Bier JW, Jackson GJ. 2002a. Parasites and the food supply. *Food Technol* 56: 72–81.

Orlandi PA, Lampel KA, South PK, Assar SK, Carter L, Levy DD. 2002b. Analysis of flour and food samples for cry9C from bioengineered corn. *J Food Prot* 65: 426-431.

Palmer CS, Traub RJ, Robertson ID, Devlin G, Rees R, Thompson RC. 2008. Determining the zoonotic significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Australian dogs and cats. *Vet Parasitol* 154: 142-147.

Pleshinger J, Weidner E. 1985. The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca^{2+} influx. *J Cell Biol* 100: 1834-1838.

Plutzer J, Ongerth J, Karanis P. 2010. Giardia taxonomy, phylogeny and epidemiology: Facts and open questions. *Int J Hyg Environ Health* 213: 321-333.

Read C, Walters J, Robertson ID, Thompson RC. 2002. Correlation between genotype of *Giardia duodenalis* and diarrhoea. *Int J Parasitol* 32: 229-231.

Read CM, Monis PT, Thompson RC. 2004. Discrimination of all genotypes of *Giardia duodenalis* at the glutamate dehydrogenase locus using PCR-RFLP. *Infect Genet Evol* 4: 125-130.

Reetz J, Rinder H, Thomschke A, Manke H, Schwebs M, Bruderek A. 2002. First detection of the microsporidium *Enterocytozoon bienersi* in non-mammalian hosts (chickens). *Int J Parasitol* 32: 785-787.

Roberts-Thomson IC. 1993. Genetic studies of human and murine giardiasis. *Clin Infect Dis* 16 Suppl 2: S98-104.

Robertson ID, Irwin PJ, Lymbery AJ, Thompson RC. 2000. The role of companion animals in the emergence of parasitic zoonoses. *Int J Parasitol* 30: 1369-1377.

Robertson LJ, Forberg T, Hermansen L, Hamnes IS, Gjerde B. 2007. *Giardia duodenalis* cysts isolated from wild moose and reindeer in Norway: genetic characterization by PCR-rflp and sequence analysis at two genes. *J Wildl Dis* 43: 576-585.

Sadler F, Peake N, Borrow R, Rowl PL, Wilkins EG, Curry A. 2002. Genotyping of *Enterocytozoon bienersi* in AIDS patients from the north west of England. *The Journal of Infection* 44: 39–42.

Santin M, Fayer R. 2009. *Enterocytozoon bienersi* genotype nomenclature based on the internal transcribed spacer sequence: a consensus. *J Eukaryot Microbiol* 56: 34-38.

Santin M, Fayer R. 2011. Microsporidiosis: *Enterocytozoon bienersi* in domesticated and wild animals. *Res Vet Sci* 90: 363-371.

Santin M, Trout JM, Fayer R. 2004. Prevalence of *Enterocytozoon bieneusi* in post-weaned dairy calves in the eastern United States. *Parasitol Res* 93: 287-289.

Santin M, Trout JM, Fayer R. 2009. A longitudinal study of *Giardia duodenalis* genotypes in dairy cows from birth to 2 years of age. *Vet Parasitol* 162: 40–45.

Santin M, Cortés Vecino JA, Fayer R. 2008. *Enterocytozoon bieneusi* genotypes in dogs in Bogota, Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 79: 215–217.

Santin M, Trout JM, Vecino JA, Dubey JP, Fayer R. 2006. *Cryptosporidium*, *Giardia* and *Enterocytozoon bieneusi* in cats from Bogota (Colombia) and genotyping of isolates. *Vet Parasitol* 141: 334–339.

Savioli L, Smith H, Thompson A. 2006. *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends Parasitol* 22: 203-208.

Schmidt EC, Shadduck JA. 1983. Murine encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infect Immun* 40: 936-942.

Schmidt EC, Shadduck JA. 1984. Mechanisms of resistance to the intracellular protozoan *Encephalitozoon cuniculi* in mice. *J Immunol* 133: 2712-2719.

Schottelius J, Schmetz C, Kock NP, Schuler T, Sobottka I, Fleischer B. 2000. Presentation by scanning electron microscopy of the life cycle of microsporidia of the genus *Encephalitozoon*. *Microbes Infect* 2: 1401-1406.

Schwartz DA, Bryan RT. 1999. Microsporidial infections: progress in epidemiology and prevention. En: Scheld WM, Hughes JM. (Ed.) *Emerging Infections*. Washington DC, p 73–98.

Shadduck JA, Orenstein JM. 1993. Comparative pathology of microsporidiosis. *Arch Pathol Lab Med* 117: 1215-1219.

Shadduck JA, Storts R, Adams LG. 1996. Selected examples of emerging and reemerging infectious diseases in animals. *Am. Soc. Microbiol. News* 62: 586–588.

Sharpstone D, Rowbottom A, Francis N, Tovey G, Ellis D, Barrett M, Gazzard B. 1997. Thalidomide: a novel therapy for microsporidiosis. *Gastroenterology* 112: 1823-1829.

Slifko TR, Smith HV, Rose JB. 2000. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Int J Parasitol* 30: 1379-1393.

Snowden KF, Didier ES, Orenstein JM, Shadduck JA. 1998. Animal models of human microsporidial infections. *Lab Anim Sci* 48: 589-592.

Snowden KF, Shadduck JA. 1999. Microsporidia of higher vertebrates. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 393–419.

Sparfel JM, Sarfati C, Liguory O, Caroff B, Dumoutier N, Gueglio B, Billaud E, Raffi F, Molina JM, Miegerville M, Derouin F. 1997. Detection of microsporidia and identification of *Enterocytozoon bienersi* in surface water by filtration followed by specific PCR. *J Eukaryot Microbiol* 44: 78S.

Sprong H, Caccio SM, van der Giessen JW. 2009. Identification of zoonotic genotypes of *Giardia duodenalis*. *PLoS Negl Trop Dis* 3: e558.

Steuart RF, O'Handley R, Lipscombe RJ, Lock RA, Thompson RC. 2008. Alpha 2 giardin is an assemblage A-specific protein of human infective *Giardia duodenalis*. *Parasitology* 135: 1621-1627.

Sulaiman IM, Fayer R, Lal AA, Trout JM, Schaefer FW 3rd, Xiao L. 2003a. Molecular characterization of microsporidia indicates that wild mammals Harbor host-

adapted *Enterocytozoon* spp. as well as human-pathogenic *Enterocytozoon bieneusi*. *Appl Environ Microbiol* 69: 4495-4501.

Sulaiman IM, Fayer R, Bern C, Gilman RH, Trout JM, Schantz PM, Das P, Lal AA, Xiao L. 2003b. Triosephosphate isomerase gene characterization and potential zoonotic transmission of *Giardia duodenalis*. *Emerg Infect Dis* 9: 1444-1452.

Sulaiman IM, Fayer R, Yang C, Santin M, Matos O, Xiao L. 2004. Molecular characterization of *Enterocytozoon bieneusi* in cattle indicates that only some isolates have zoonotic potential. *Parasitol Res* 92: 328-334.

Tamura K, Nei M, Kumar S. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 11030-11035.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Tangtrongsup S, Scorza V. 2010. Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp infections in dogs and cats. *Top Companion Anim Med* 25: 155-162.

ten Hove RJ, Van Lieshout L, Beadsworth MB, Perez MA, Spee K, Claas EC, Verweij JJ. 2009. Characterization of genotypes of *Enterocytozoon bieneusi* in immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 56: 388–393.

Thellier M, Breton J. 2008. *Enterocytozoon bieneusi* in human and animals, focus on laboratory identification and molecular epidemiology. *Parasite* 15: 349-358.

Thompson RC. 2004. The zoonotic significance and molecular epidemiology of *Giardia* and giardiasis. *Vet Parasitol* 126: 15-35.

Thompson RC, Hopkins RM, Homan WL. 2000. Nomenclature and genetic groupings of *Giardia* infecting mammals. *Parasitol Today* 16: 210-213.

Thompson RC, Monis PT. 2004. Variation in *Giardia*: implications for taxonomy and epidemiology. *Adv Parasitol* 58: 69-137.

Thompson RC, Palmer CS, O'Handley R. 2008. The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals. *Vet J* 177: 18-25.

Thompson RC, Reynoldson JA, Mendis AH. 1993. *Giardia* and giardiasis. *Adv. Parasitol*, 32.

Thompson RCA, Morgan UM, Mellor KJ, Hopkins RM. 1999. Genotyping *Giardia* and *Cryptosporidium*. *Today's Life Sci* 11: 80–86.

Thurston-Enriquez JA, Watt P, Dowd SE, Enriquez R, Pepper IL, Gerba CP. 2002. Detection of protozoan parasites and microsporidia in irrigation waters used for crop production. *J Food Prot* 65: 378-382.

Tourtip S, Wongtripop S, Stentiford GD, Bateman KS, Sriurairatana S, Chavadej J, Sritunyalucksana K, Withyachumnarnkul B. 2009. *Enterocytozoon hepatopenaei* sp. nov. (Microsporida: Enterocytozoonidae), a parasite of the black tiger shrimp *Penaeus monodon* (Decapoda: Penaeidae): Fine structure and phylogenetic relationships. *J Invertebr Pathol* 102: 21-29.

Trammer T, Dombrowski F, Doehring M, Maier WA, Seitz HM. 1997. Opportunistic properties of *Nosema algerae* (Microspora), a mosquito parasite, in immunocompromised mice. *J Eukaryot Microbiol* 44: 258-262.

Traub RJ, Inpankaew T, Reid SA, Sutthikornchai C, Sukthana Y, Robertson ID, Thompson RC. 2009. Transmission cycles of *Giardia duodenalis* in dogs and humans

in Temple communities in Bangkok--a critical evaluation of its prevalence using three diagnostic tests in the field in the absence of a gold standard. *Acta Trop* 111: 125-132.

Trout JM, Santin M, Fayer R. 2008. Detection of Assemblage A, *Giardia duodenalis* and *Eimeria* spp. in alpacas on two Maryland farms. *Vet Parasitol* 153: 203-208.

Tumwine JK, Kekitiinwa A, Nabukeera N, Akiyoshi DE, Buckholt MA, Tzipori S. 2002. *Enterocytozoon bieneusi* among children with diarrhea attending Mulago hospital in Uganda. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 67: 299–303.

Tzipori S, Carville A, Widmer G, Kotler D, Mansfield K, Lackner A. 1997. Transmission and establishment of a persistent infection of *Enterocytozoon bieneusi*, derived from a human with AIDS, in simian immunodeficiency virus-infected rhesus monkeys. *J Infect Dis* 175: 1016-1020.

Uehlinger FD, O'Handley RM, Greenwood SJ, Guselle NJ, Gabor LJ, Van Velsen CM, Steuart RF, Barkema HW. 2007. Efficacy of vaccination in preventing giardiasis in calves. *Vet Parasitol* 146: 182-188.

Uehlinger FD, Greenwood SJ, O'Handley R, McClure JT, Coklin T, Dixon BR, de Boer M, Zwiers H, Barkema HW. 2011. Prevalence and genotypes of *Giardia duodenalis* in dairy and beef cattle in farms around Charlottetown, Prince Edward Island, Canada. *Can Vet J* 52:967-972.

Undeen AH. 1990. A proposed mechanism for the germination of microsporidian (Protozoa: Microspora) spores. *J Theor Biol* 142: 223-225.

Undeen AH, Alger NE. 1976. *Nosema algerae*: infection of the white mouse by a mosquito parasite. *Exp Parasitol* 40: 86-88.

Undeen AH, Avery SW. 1988. Effects of anions on the germination of *Nosema algerae* (Microspora: Nosematidae) spores. *J Invertebr Pathol* 52: 84-89.

Undeen AH, Frixone E. 1991a. The role of osmotic pressure in the germination of *Nosema algerae* spores. *J Protozool* 37: 561-567.

Undeen AH, Frixone E. 1991b. Structural alterations of the plasma membrane in spores of the microsporidium *Nosema algerae* on germination. *J Protozool* 38: 511-518.

Upton SJ, Zien CA. 1997. Description of a *Giardia varani*-like flagellate from a water monitor, *Varanus salvator*, from Malaysia. *J Parasitol* 83: 970-971.

van der Giessen JW, de Vries A, Roos M, Wielinga P, Kortbeek LM, Mank TG. 2006. Genotyping of *Giardia* in Dutch patients and animals: a phylogenetic analysis of human and animal isolates. *Int J Parasitol* 36: 849-858.

van Gool T, Vetter JC, Weinmayr B, Van Dam A, Derouin F, Dankert J. 1997. High seroprevalence of *Encephalitozoon* species in immunocompetent subjects. *J Infect Dis* 175: 1020-1024.

Vavra J, Larsson R. 1999. Structure of the microsporidia. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 7–84.

Vossbrinck CR, Maddox JV, Friedman S, Debrunner-Vossbrinck BA, Woese CR. 1987. Ribosomal RNA sequence suggests microsporidia are extremely ancient eukaryotes. *Nature* 326: 411-414.

Wasson K, Peper RL. 2000. Mammalian microsporidiosis. *Vet Pathol* 37: 113-128.

Weber R, Bryan RT, Schwartz DA, Owen RL. 1994. Human microsporidial infections. *Clin Microbiol Rev* 7: 426-461.

Weber R, Deplazes P, Schwartz D. 2000. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol* 6: 166-192.

Webster JD, Miller MA, Vemulapalli R. 2008. *Encephalitozoon cuniculi*-associated placentitis and perinatal death in an alpaca (*Lama pacos*). *Vet Pathol* 45: 255-258.

Weidner E. 1976. The microsporidian spore invasion tube. The ultrastructure, isolation, and characterization of the protein comprising the tube. *J Cell Biol* 71: 23-34.

Weidner E. 1982. The microsporidian spore invasion tube. III. Tube extrusion and assembly. *J Cell Biol* 93: 976-979.

Weidner E, Byrd W. 1982. The microsporidian spore invasion tube. II. Role of calcium in the activation of invasion tube discharge. *J Cell Biol* 93: 970-975.

Weidner E, Sibley LD. 1985. Phagocytized intracellular microsporidian blocks phagosome acidification and phagosome-lysosome fusion. *J Protozool* 32: 311-317.

Weiser J. 1959. *Nosema laphygmae* n. sp. and the internal structure of the microsporidian spore. *J Insect Pathol* 1: 52-59.

Weiss L, Vossbrinck C. 1999. Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the Microsporidia. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *American Society of Microbiology*, Washington, DC, p 129–171.

West AF, Jr. 1960. The biology of a species of *Nosema* (Sporozoa: Microsporidia) parasitic in the flour beetle *Tribolium confusum*. *J Parasitol* 46: 747-753.

Wittner M. 1999. Historic perspective on the microsporidia: expanding horizons. En: Wittner M, Weiss L. (Ed.) *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society of Microbiology, Washington, DC, p 1-6.

Wright JH, Craighead EM. 1922. Infectious Motor Paralysis in Young Rabbits. *J Exp Med* 36: 135-140.

Xiao L. 1994. Giardia infection in farm animals. *Parasitol Today* 10: 436-438.

Xiao L, Fayer R. 2008. Molecular characterisation of species and genotypes of *Cryptosporidium* and *Giardia* and assessment of zoonotic transmission. *Int J Parasitol* 38: 1239-1255.

Xiao L, Herd RP. 1993. Quantitation of *Giardia* cysts and *Cryptosporidium* oocysts in fecal samples by direct immunofluorescence assay. *J Clin Microbiol* 31: 2944-2946.

Xiao L, Herd RP. 1994. Infection pattern of *Cryptosporidium* and *Giardia* in calves. *Vet Parasitol* 55: 257-262.

Xiao L, Saeed K, Herd RP. 1996. Efficacy of albendazole and fenbendazole against *Giardia* infection in cattle. *Vet Parasitol* 61: 165-170.

Xu Y, Weiss LM. 2005. The microsporidian polar tube: a highly specialised invasion organelle. *Int J Parasitol* 35: 941-953.

Yang R, Reid A, Lymbery A, Ryan U. 2010. Identification of zoonotic *Giardia* genotypes in fish. *Int J Parasitol* 40: 779-785.

Yoder JS, Harral C, Beach MJ. 2010. Giardiasis surveillance - United States, 2006-2008. *MMWR Surveill Summ* 59: 15-25.

Zhang Q, Singh I, Sheoran A, Feng X, Nunnari J, Carville A, Tzipori S. 2005. Production and characterization of monoclonal antibodies against *Enterocytozoon bieneusi* purified from rhesus macaques. *Infect Immun* 73: 5166-5172.

VIII. APÉNDICE

Anexo 1. Lista actual de genotipos de *E. bieneusi* (Santin *et al.*, 2011)

Nombre del genotipo (sinonimos)	Hospedero
A (Peru1)	Humano
B (Type I)	Humano
C (Type II)	Humano
Q	Humano
R	Humano
S	Humano
T	Humano
U	Humano
V	Humano
W	Humano
Peru3	Humano
Peru7	Humano
Peru8	Humano
Peru11 (Peru12)	Humano
Peru13	Humano
Peru15	Humano
CAF2	Humano
CAF3	Humano
CAF4	Humano
Type III	Humano
Type V	Humano
NIA1	Humano
HAN1	Humano
UG2145	Humano
Peru 17	Humano
S1	Humano
S2	Humano
S3	Humano
S4	Humano
S5	Humano
S6	Humano
S7	Humano
S8	Humano
S9	Humano

D (WL8, Peru9, PigEBITS9, PtEb VI, CEbC)	Humano, cerdo, bovinos, castor, zorro, comadreja, mapache, halcon, equino, canino, macacos
CAF1 (PEbE)	Humano, cerdo
EbpC (E, WL13, Peru4, WL17)	Humano, cerdo, castor, nutria, comadreja, mapache, zorro
Peru16	Humano, cobayo
Peru10	Humano, gato
Type IV (K, Peru2, BEB5, BEB5-var, CMITS1, PtEBIII)	Humano, bovino, gato, canino
WL11 (Peru5)	Humano, canino, zorro, gato
O	Humano, cerdo
PigEBITS7	Humano, cerdo
Peru6 (PtEb I, PtEb VII)	Humano, aves, caninos, bovino
WL15 (WL16, Peru14)	Humano, zorro, castor, comadreja, mapache
I (BEB2, CEbE)	Bovino
BEB3	Bovino
BEB4	Bovino
BEB6	Bovino
BEB7	Bovino
4948 FL-2 2004	Bovino
PtEb XI	Bovino
CEbA	Bovino
CEbD	Bovino
CEbF	Bovino
M	Bovino
N	Bovino
J (BEB1, CEbB, PtEb X)	Bovino, aves
EbpA (F)	Bovino, cerdo
G	Cerdo
H (PEbC)	Cerdo
PigITS1	Cerdo
PigITS2	Cerdo
PigITS3 (PEbB)	Cerdo

PigITS4 (PEbD)	Cerdo
PigITS5 (PEbA)	Cerdo
PigITS6	Cerdo
PigITS8	Cerdo
E1	Cerdo
F1	Cerdo
L	Gato
EbfelA	Gato
PtEb IV	Gato
PtEb VIII	Gato
D-like	Gato
PtEb IX	Canino
Horse1	Equino
Horse2	Equino
WL1	Mapache
WL2	Mapache
WL3	Mapache
WL4	Comadreja
WL6	Comadreja
WL10	Comadreja
WL14	Comadreja
WL7	Castor
WL9	Castor
WL12	Castor, nutria
PtEb V	Kudu
PtEb XII	Mono Titi
P	Llama
PtEb II	Aves
Peru6-var	Aves

Instruction Manual

FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil

Rapid Isolation of PCR - Ready Genomic DNA from Soil Samples Using the FastPrep® System

> One Call

> One Source

> A World of Biotechnology Reagents

www.mpbio.com

MP Biomedicals • 29525 Fountain Parkway • Solon, OH 44139 • Tel: 1.800.854.0530 • Fax: 1.800.334.6999

MP

FastDNA® 50ml Spin Kit for Soil

Lyse BIG and FAST with Interchangeable Adapters!

QuickPrep™ Adapter
24 x 2 ml samples

TeenPrep™ Adapter
12 x 15ml samples

HighPrep™ Adapter
48 x 2ml samples

BigPrep™ Adapter
2 x 50 ml samples

The FastPrep-24 instrument is delivered with the QuickPrep™ Adapter

MP

FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil

**Rapid Isolation of PCR-Ready Genomic DNA
from Soil Samples Using the FastPrep® System**

10 Preps

Storage:
Ambient temperature (15 – 30°C)

Catalog # 6560-600

Revision # 6560-600-10JUN

www.mpbio.com



www.mpbio.com

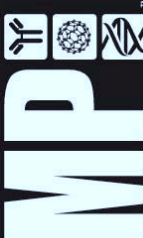


TABLE OF CONTENTS

1. Introduction to the FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil and the FastPrep® Instruments.....	5
2. Kit Components and User Supplied Materials.....	5
2.1 FastDNA® SPIN Kit for Soil Components.....	5
2.2 User Supplied Materials.....	6
3. Important Considerations Before Use.....	6
3.1 Preparation of SEWS-M Wash Solution.....	6
3.2 Sample Lysis with the FastPrep® Instrument.....	6
4. Safety Precautions.....	7
5. Protocol.....	7
6. Troubleshooting.....	9
7. Example Data: DNA Isolation from Soil Samples and Gel Electrophoresis.....	9
8. Recommended Reference Format for Publication.....	10
9. References.....	10
10. Related Products.....	11
11. Product Use Limitation & Warranty.....	12

1. Introduction to the FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil and the FastPrep® Instruments

The FastDNA® 50 ml SPIN Kit for Soil quickly and efficiently isolates genomic DNA directly from soil samples. Designed for use with the FastPrep®-24 Instrument from MP Biomedicals, plant and animal tissues, bacteria, algae, fungal spores, and other organisms of a soil population are easily lysed within 40 seconds. The FastPrep®-24 Instrument uses a unique, optimized motion to homogenize samples by multidirectional, simultaneous impactation with lysing matrix particles. It provides an extremely quick, efficient and highly reproducible homogenization that surpasses traditional extraction methods using enzymatic digestion, sonication, blending, douncing and vortexing. Samples are placed into 50.0 ml tubes containing Garnet Lysing Matrix, a mixture of irregularly shaped garnet particles designed to efficiently lyse all soil organisms including historically difficult sources such as eubacterial spores and endospores, gram positive bacteria, yeast, algae, nematodes and fungi. Soil samples are pre-treated by washing in a Pre-Lysis Buffer. Homogenization in the FastPrep® - 24 Instrument with Garnet Lysing Matrix takes place in the presence of MT Buffer and Sodium Phosphate Buffer. The pre-lysing and lysing reagents were carefully developed to eliminate contaminants and to protect and solubilize nucleic acids upon cell lysis. These reagents work together to facilitate extraction of genomic DNA with minimal RNA or humic acid contamination. Following lysis, samples are centrifuged to pellet debris and lysing matrix. DNA is purified from the supernatant with a silica-based GENECLAN® procedure using SPIN filter columns. Eluted DNA is ready for digestion, electrophoresis, PCR and any other desired application.

2. Kit Components and User Supplied Materials

2.1 FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil Components

Garnet Lysing Matrix Tubes (50 ml)	10 each
PLS Solution	60 ml
MT Buffer	15 ml
Sodium Phosphate Buffer	350 ml
PPS for Soil	25 ml
Binding Matrix	120 ml
GTC Wash Buffer	120 ml
SEWS-M	12 ml
TES	60 ml
BBS Gel Loading Dye	200 ul
SPIN Filter Tubes (50 ml)	10 each
Collection Tubes (50 ml)	20 each

www.mpbio.com

5



FastDNA® 50ml Spin Kit for Soil

User manual	1 each
MSDS (Online: www.mpbio.com)	1 each
Certificate of Analysis	1 each

2.2 User Supplied Materials

FastPrep® -24 Instrument (see Section 9)
 FastPrep® BigPrep Adapter (2x50ml tubes)
 Centrifuge that can freely spin 50 ml tubes
 Centrifuge tubes (50 ml)
 Sterile 15 ml tubes for DNA binding
 Rotator or low-speed vortex
 100% Ethanol

3. Important Considerations Before Use

3.1 Preparation of SEWS-M

The FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil contains SEWS-M, which is a plastic screw-top bottle containing 12 ml of a concentrated salt wash solution. Before using this buffer, add 100 ml of 100% ethanol and mark on the bottle label the date ethanol was added. Ensure that the bottle is securely closed to prevent evaporation, and store at room temperature

3.2 Sample Lysis with the FastPrep® Instrument

The fill volume in the lysing matrix tube after the addition of the Sodium Phosphate and MT Buffer Solution to the sample should allow sufficient air space in the sample tube for efficient FastPrep® Instrument processing. MP Biomedicals recommends using 5-10 g of starting material as long as there is between 15 – 25 ml of empty space in the tube. Sample loss or tube failure may result from overfilling the matrix tube. The matrix tube caps must be secure, but not over-tightened, to prevent sample leakage. If the sample is too large for processing in a single tube, divide the sample and process using multiple tubes.

MP Biomedicals' Lysing Matrix particles and tubes have been rigorously tested and validated in the FastPrep®-24 Instrument. The use of other products with the FastPrep®-24 Instrument is not recommended and may result in sample loss or instrument failure.

A single 40 second run at a speed setting of 4.0 m/s in the FastPrep®-24 Instrument is sufficient to lyse almost all samples. Higher speeds may induce DNA shearing. If the user experimentally determines that additional processing time is required, the sample

6

www.mpbio.com



should be incubated on ice in the Garnet Lysing Matrix tube for at least 2 minutes between successive FastPrep®-24 Instrument homogenizations to prevent overheating the sample and tube

4. Safety Precautions

PLS Solution, Binding Matrix and GTC Wash Buffer contain components that, when in contact with human tissue, may cause irritation. Wear personal protective equipment to prevent contact with the skin or mucus membranes (gloves, lab coat, and eye protection). Consult the Material Safety Data Sheet at www.mpbio.com for additional details.

5. Protocol

1. In a **50 ml Garnet Lysing Matrix tube**, add a maximum of 10 grams soil (5-10g), 15 ml **Sodium Phosphate Buffer**, and 5 ml **PLS Solution**. Shake to mix then vortex 10-15 seconds. Place on a rocker for 5 minutes at room temperature.

NOTE: Shake PLS solution before each use.

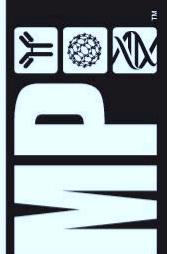
2. Centrifuge samples at 3500 x g for 10 minutes.
3. Decant supernatant and any floating soil particles (wooded soil).
4. Add 9.8 ml **Sodium Phosphate Buffer** and 1.2 ml **MT Buffer**. Shake vigorously to mix, then vortex 10-15 seconds.
5. Homogenize samples in the FastPrep®-24 Instrument at setting 4.0 m/s for 40 seconds.
6. Centrifuge samples at 3500 x g for 5 minutes.

NOTE: Extending centrifugation to 10 - 15 minutes can enhance elimination of excessive debris from large samples, or from cells with complex walls.

7. Carefully transfer the supernatant to a clean **50 ml Collection tube** (supplied).

www.mpbio.com

7



FastDNA® 50ml Spin Kit for Soil

8. Add 2.5 ml of **PPS for Soil**, shake vigorously to mix, and incubate at 4°C for 10 minutes. Do not vortex!

9. Centrifuge samples at 3500 x g for 5 minutes.

10. While samples are centrifuging, add 10 ml of **Binding Matrix** solution to a clean **50 ml SPIN Filter tube** (supplied).

Optional Step -- Filter the supernatant in the following step using a 20-30 ml syringe and a 0.22 - 1.0 um syringe filter to eliminate remaining wooded soil particles.

11. Transfer supernatant to the **SPIN Filter tube**. Shake gently by hand to mix, then place on a shaker/rocker for 3-5 minutes. Do not vortex!

12. Centrifuge samples at 3500 x g for 3 minutes. Discard the flow-through.

13. Wash the sample with 10 ml **GTC Wash Buffer**. Flick the tube or shake gently to resuspend the pellet. Do not vortex!

14. Centrifuge samples at 3500 x g for 3 minutes. Discard the flow-through.

15. Add 6 ml of **SEWS-M** solution to the sample. Flick the tube or shake gently to resuspend the pellet. Do not vortex!

NOTE: Ensure that ethanol has been added to the SEWS-M. See section 3.1.

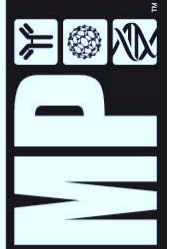
16. Centrifuge samples at 3500 x g for 5 minutes. Discard the flow-through. Centrifuge again for 5 minutes to extract residual ethanol and dry the samples.

17. Transfer the spin column to a clean **50 ml Collection tube**. Elute DNA by adding 5 ml of **TES**. Flick the tube or shake gently to resuspend the pellet. Do not vortex!

18. Centrifuge samples at 3500 x g for 5 minutes to elute purified DNA into the clean Collection tube. Discard the SPIN filter. DNA is now ready for PCR and other downstream applications. Store at -20°C for extended periods or 4°C until use.

8

www.mpbio.com



6. Troubleshooting

6.1 Humic Acid Contamination

Soil samples often contain very high levels of humic acids which may co-purify with the genomic DNA. PCR applications are hindered by the presence of humic acid. If the final eluted DNA returns a negative PCR result, then humic acid contamination might be the reason. The FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil is designed to eliminate humic acid contamination in soils. However, if humic acid contamination is still suspected after following the standard protocol, repeat the protocol from the beginning with a fresh soil sample and repeat step #1 once (pre-lysis wash), as well as step #13 once (GTC wash).

7. Example Data: DNA Isolation from Soil Samples and Gel Electrophoresis



DNA from soil samples extracted with the FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil. Approximately 10ul of eluted DNA was loaded on a 1.0% agarose gel (0.5X TAE). Lane 1: 1kb Plus DNA ladder; Lane 2: 10g creek bed soil (sandy); Lane 3: 10g corn field soil; Lane 4: 10g vegetable garden soil; Lane 5: compost soil; Lane 6: 10g mossy soil; Lane 7: 10g pond soil; Lane 8: 10g pine tree soil; Lane 9: 10g mulch soil (wooded); Lane 10: 1kb Plus DNA ladder.

8. Recommended Reference Format for Publications

DNA was isolated from (specific sample) using the FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil and the FastPrep® -24 Instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA)

9. References

- Ando A, et al. (2005). Appl. Envir. Microbiol. Nov(71)11:7075-82.
- Bælum J, et al. (2006). Appl. Envir. Microbiol. Feb; 72(2):1476-86.
- Braid MD, et al. (2003). J Microbiol Methods. Mar;52(3):389-93.
- Dong D, et al. (2006). J Microbiol Methods. Aug;66(2):217-22.
- Francis, CA, et al. (2005). PNAS. Vol 102: 14683 - 14688
- Kuntz RL, et al. (2004). Water Res. Sep;38(16):3551-7.
- Layton A, et al. (2006). Appl. Envir. Microbiol. Jun;72(6):4214-24.
- Mincer, T.J, et al. (2005). Appl. Envir. Microbiol., Vol 71: 7019 - 7028.
- Segawa, T, et al. (2005). Appl. Envir. Microbiol., Vol 71: 123 - 130

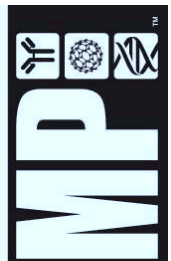
FastDNA® 50ml Spin Kit for Soil

10. Related Products

Description	Size	Catalog #
FastPrep® 24 Instrument	100-230V	6002-500
FastPrep® FP100A Instrument	100V	6001-100
FastPrep® FP120A Instrument	120V	6001-120
FastPrep® FP220A Instrument	220V	6001-220
FastDNA® Kit	100 preps	6540-400
FastDNA® SPIN Kit	100 preps	6540-600
FastDNA® SPIN Kit for Soil	50 preps	6560-200
FastDNA® SPIN Kit for Feces	50 preps	6570-200
FastRNA® Pro Soil-Direct Kit	50 preps	6070-050
FastRNA® Pro Soil-Indirect Kit	50 Preps	6075-050
FastRNA® Pro Red Kit (Yeast & Fungus)	50 preps	6035-050
FastRNA® Pro Green Kit (Plant & Animal)	50 preps	6045-050
FastRNA® Pro Blue Kit (Bacteria)	50 preps	6025-050
FastProtein™ Blue Matrix	50 preps	6550-400
FastProtein™ Red Matrix	50 preps	6550-600
Lysing Matrix E	50 x 2 ml tubes	6914-050
Lysing Matrix E	100 x 2 ml tubes	6914-100
Lysing Matrix E	500 x 2 ml tubes	6914-500

www.mpbio.com

11



11. Product Use Limitation & Warranty

The products presented in this instruction manual are for research or manufacturing use only. They are not to be used as drugs or medical devices in order to diagnose, cure, mitigate, treat or prevent diseases in humans or animals, either as part of an accepted course of therapy or in experimental clinical investigation. These products are not to be used as food, food additives or general household items. Purchase of MP Biomedicals products does not grant rights to reproduce, modify, or repackage the products or any derivative thereof to third parties. MP Biomedicals makes no warranty of any kind, expressed or implied, including merchantability or fitness for any particular purpose, except that the products sold will meet our specifications at the time of delivery. Buyer's exclusive remedy and the sole liability of MP Biomedicals hereunder shall be limited to, at our discretion, no replacement or compensation, product credits, refund of the purchase price of, or the replacement of materials that do not meet our specification.

By acceptance of the product, Buyer indemnifies and holds MP Biomedicals harmless against, and assumes all liability for, the consequence of its use or misuse by the Buyer, its employees or others, including, but not limited to, the cost of handling. Said refund or replacement is conditioned on Buyer notifying within thirty (30) days of receipt of product. Failure of Buyer to give said notice within thirty (30) days shall constitute a waiver by the Buyer of all claims hereunder with respect to said material(s). FastDNA®, FastRNA®, FastPrep®, QBiogene®, and BIO 101® Systems are registered trademarks of MP Biomedicals, LLC.

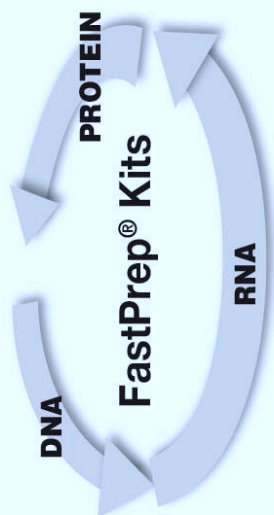
Take Advantage of FastPrep® Kits Ready-to-use Protocols For DNA, RNA And Protein Isolation From Any Sample

- Rapid and reproducible sample lysis and purification process
- No cross contamination with the closed lysing matrix tubes
- Increased yields of high quality DNA, RNA and proteins
- Integrity and size of DNA, RNA and proteins are retained
- Nucleic acids and proteins are ready-to-use in downstream application

12

www.mpbio.com





FastDNA® Kit and FastDNA® Spin Kit

Cat N° 6540-400 - Cat N° 6540-600 respectively (100 preps)

- Lyse and isolate DNA in less than 30 minutes
- Plant, animal, yeast, fungal and microbial samples
- No hazardous organic reagents required
- SPIN filters streamline silica handling (FastDNA Spin Kit)

FastDNA® Spin Kit for Soil

Cat N° 6560-200 (100 preps)

- Lyse and isolate DNA in less than 30 minutes
- Variety of soil and environmental sample types
- No hazardous organic reagents required
- SPIN filters streamline silica handling

FastDNA® Spin Kit for Feces

Cat N° 6570-200 (50 preps)

- Lyse and isolate PCR-ready DNA in less than 30 minutes
- Variety of stool sample types
- No hazardous organic reagents required
- SPIN filters streamline silica handling

FastRNA® Pro Blue Kit

Cat N° 6025-050 (50 preps)

- For use with gram positive and gram negative bacteria
- Lyse up to 10¹⁰ cells per 2ml tube
- Lysis and isolation with single-phase organic solution in less than 90 minutes

13

www.mpbio.com



FastDNA® 50ml Spin Kit for Soil

FastRNA® Pro Red Kit

Cat N° 6035-050 (50 preps)

- For use with yeast cells and fungal tissue
- Lyse up to 10¹⁰ cells per 2ml tube
- Lysis and isolation with single-phase organic solution in less than 90 minutes

FastRNA® Pro Green Kit

Cat N° 6045-050 (50 preps)

- For use with all plant and animal samples
- Lyse 50-100 mg tissue per 2ml tube
- Lysis and isolation with single-phase organic solution in less than 90 minutes

FastRNA® Pro Soil-Direct Kit and

FastRNA® Pro Soil-Indirect Kit

Cat N° 6070-050 - Cat N° 6075-050 respectively (50 preps)

- Isolate RNA from soil samples (direct kit) and washed soil (indirect kit) in less than 2 hours
- Variety of soil and environmental sample types
- RNA protected during and after processing
- Humic acids reduced to allow uninhibited RT-PCR
- Includes additional reagents for even further purification if necessary
- SPIN filters streamline silica handling

FastProtein™ Blue Matrix

Cat N° 6550-400 (50 preps) - Cat N° 6550-500 (100 preps)

- Release of proteins from gram positive and gram negative bacteria in 40 seconds
- Protein extracts are ready for immediate electrophoresis or purification
- Ideal for optimizing induction conditions

FastProtein™ Red Matrix

Cat N° 6550-600 (50 preps) - Cat N° 6550-700 (100 preps)

- Release of proteins from yeast cells and fungi in 40 seconds
- Protein extracts are ready for immediate electrophoresis or purification
- Ideal for optimizing induction conditions

14

www.mpbio.com



Lyse BIG and FAST with Interchangeable Adapters!

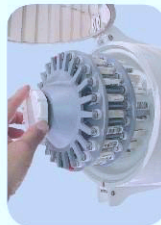
QuickPrep™ Adapter
24 x 2 ml samples



TeenPrep™ Adapter
12 x 1.5ml samples



HighPrep™ Adapter
48 x 2ml samples



BigPrep™ Adapter
2 x 50 ml samples



The FastPrep-24 instrument is delivered with the QuickPrep™ Adapter

www.mpbio.com



Instruction Manual

FastDNA® 50ml SPIN Kit for Soil

Protocol Revision # 6560-600-10JUN

Worldwide Ordering and Technical Support

United States of America
Worldwide Headquarters
Tel: +1.440.337.1200
Toll Free Tel: 800.854.0530
Fax: +1.440.337.1180
Toll Free Fax: 800.334.6999

France
MP Biomedicals France
Tel: 03 88 67 54 25
Fax: 03 88 67 19 45

Serbia
MP Global d.o.o.
Tel: +381.11.2622.945
Fax: +381.11.2623.373

Germany
MP Biomedicals
Phone: 0800 426 67337
Fax: 0800 629 67337
Toll Free Phone: 00800.7777.9999
Toll Free Fax: 00800.6666.8888

Singapore
MP Biomedicals Singapore
Tel: 65.6775.0008
Fax: 65.6775.4536

Australia
MP Biomedicals Australasia Pty Ltd
Tel: +61.2.9838.7422
Fax: +61.2.9838.7390

Japan
MP Bio Japan K.K.
Tel: 03-3808-2102
Toll Free Tel: 0120.788.020
Fax: 03-3808-2401

Switzerland
MP Biomedicals Switzerland
Tel: 061 271 0007
Fax: 061 271 0084

Belgium
MP Biomedicals
Tel: 02 466 00 00
Fax: 02 466 26 42

United Kingdom
MP Biomedicals UK
Tel: 0800 282 474
Fax: 0800 614 735

The Netherlands
MP Biomedicals Netherlands
Tel: 0800-0227416
Fax: 0800-0227489

Canada
MP Biomedicals Canada
Tel: 888.362.5487
Fax: 514.335.7541

Poland
MP Biomedicals Poland
Tel: +48.22.658.58.95
Fax: +48.22.658.45.05

www.mpbio.com

MP Biomedicals • 29525 Fountain Parkway • Solon, OH 44139 • tel: 1.800.854.0530 • fax: 1.800.334.6999



Anexo 3. Genotipos de *Enterocytozoon bieneusi* de alpacas inscritas en el GenBank

GenBank No.	ID alpaca	Parasito	Genotipo	Departamento	Sexo
KC860879	20777	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860880	19722	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Hembra
KC860881	22371	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Hembra
KC860882	19399	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	P	Cuzco	Macho
KC860883	19715	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Hembra
KC860884	22327	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Type IV	Huancavelica	Hembra
KC860885	18187	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Type IV	Cuzco	Hembra
KC860886	22361	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860887	20761	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860888	20755	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860889	22381	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	P	Huancavelica	Hembra
KC860890	20775	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860891	20758	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860892	19401	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	P	Cuzco	Hembra
KC860893	19721	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860894	19724	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860895	20767	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860896	18174	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Cuzco	Macho
KC860897	20765	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860898	20756	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860899	20762	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860900	20760	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860901	20779	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860902	22333	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860903	19720	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860904	20769	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860905	19397	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	P	Cuzco	Macho
KC860906	22368	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	D	Huancavelica	Hembra
KC860907	20757	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860908	19714	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860909	20764	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860910	19707	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Cuzco	Hembra
KC860911	20753	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860912	20752	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860913	20773	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860914	20763	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860915	22351	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP6	Huancavelica	Hembra
KC860916	19716	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860917	19705	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Cuzco	Hembra
KC860918	20774	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860919	19712	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860920	19406	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Type IV	Cuzco	Macho
KC860921	19711	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho

KC860922	19718	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860923	20754	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860924	20759	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860925	19717	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860926	22325	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP2	Huancavelica	Hembra
KC860927	20766	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860928	19400	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	P	Cuzco	Macho
KC860929	20772	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860930	22337	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP3	Huancavelica	Macho
KC860931	20776	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860932	19706	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Cuzco	Hembra
KC860933	22359	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP4	Huancavelica	Hembra
KC860934	18190	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Cuzco	Hembra
KC860935	20770	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Macho
KC860936	22365	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	D	Huancavelica	Macho
KC860937	22377	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Hembra
KC860938	18195	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	BeB6	Huancavelica	Macho
KC860939	19723	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Huancavelica	Macho
KC860940	22363	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP5	Huancavelica	Hembra
KC860941	20778	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860942	20768	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	ALP1	Puno	Hembra
KC860943	18180	<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Type IV	Cuzco	Hembra

Anexo 4. Ensamblaje de *Giardia duodenalis* de alpacas inscritas en el GenBank

Genbank No	ID_alpaca	Parasito	Ensamblaje	Departamento	Sexo
JX845426	22331	<i>Giardia duodenalis</i>	AII	Huancavelica	Macho
JX845427	22345	<i>Giardia duodenalis</i>	AII	Huancavelica	Macho
JX845429	18185	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Cuzco	Hembra
JX845430	18206	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845431	18207	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845432	18211	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845433	18212	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845434	18213	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845435	19715	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845436	19716	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845437	19718	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845438	19722	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845439	20758	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Hembra
JX845440	20759	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Macho
JX845441	20760	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Macho
JX845442	20767	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Hembra
JX845443	20768	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Hembra
JX845444	20770	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Macho
JX845445	20771	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Hembra
JX845446	20773	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Macho
JX845447	20774	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Hembra
JX845448	20775	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Macho
JX845449	20779	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Puno	Hembra
JX845451	22323	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845452	22335	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845453	22347	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845454	22353	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845455	22355	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845456	22357	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845457	22361	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Macho
JX845458	22363	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845459	22371	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845460	22381	<i>Giardia duodenalis</i>	AI	Huancavelica	Hembra
JX845463	18173	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Macho
JX845464	18174	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Macho
JX845465	18176	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Macho
JX845466	18186	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Hembra
JX845467	18187	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Hembra
JX845468	19399	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Macho

JX845469	19400	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Macho
JX845470	19401	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Hembra
JX845471	19714	<i>Giardia duodenalis</i>	E	Cuzco	Macho